

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

English Abstract

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : A61K 31/435	A1	(11) International Publication Number: WO 00/03711 (43) International Publication Date: 27 January 2000 (27.01.00)
(21) International Application Number: PCT/US99/16066 (22) International Filing Date: 16 July 1999 (16.07.99) (30) Priority Data: 09/118,388 17 July 1998 (17.07.98) US (71) Applicant (for all designated States except US): THE PI-COWER INSTITUTE FOR MEDICAL RESEARCH [US/US]; 350 Community Drive, Manhasset, NY 11030 (US). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): TRACEY, Kevin, J. [-/US]; 17 Highview Avenue, Old Greenwich, CT 06870 (US). AL-ABED, Yousef [-/US]; Apartment 5C., 1435 York Avenue, New York, NY 10021 (US). IVANOVA, Svetlana [-/US]; 22-31-35th Street, Astoria, NY 11105 (US). BUCALA, Richard, J. [-/US]; 22 Benenson Drive, Cos Cob, CT 06807 (US). (74) Agent: OSTER, Jeffrey, B.; Davis Wright Tremaine LLP, 2600 Century Square, 1501 Fourth Avenue, Seattle, WA 98101-1688 (US).	(81) Designated States: AU, CA, JP, US, European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>	
(54) Title: COMPOUNDS AND COMPOSITIONS FOR TREATING TISSUE ISCHEMIA		
(57) Abstract There is disclosed a genus of compounds and pharmaceutical compositions that are protective for mitigating damage associated with tissue ischemia, particularly stroke (CNS ischemia), and ischemia of the myocardium. The present invention further provides a method for treating tissue damage caused by ischemia. Lastly, the present invention provides a method for treating tissue damage caused by providing a compound that inhibits the cytotoxic activity of 3-aminopropanal.		

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-520360

(P2002-520360A)

(43) 公表日 平成14年7月9日 (2002.7.9)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	P I	キーワード (参考)
C 0 7 D 213/79		C 0 7 D 213/79	2 G 0 4 5
A 6 1 K 31/426		A 6 1 K 31/426	4 C 0 3 3
31/4425		31/4425	4 C 0 5 5
A 6 1 P 39/00		A 6 1 P 39/00	4 C 0 8 6
43/00		43/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 71 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2000-559846(P2000-559846)
 (86) (22) 出願日 平成11年7月16日 (1999.7.16)
 (85) 翻訳文提出日 平成13年1月17日 (2001.1.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US99/16066
 (87) 国際公開番号 WO00/03711
 (87) 国際公開日 平成12年1月27日 (2000.1.27)
 (31) 優先権主張番号 09/118, 388
 (32) 優先日 平成10年7月17日 (1998.7.17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (81) 指定国 EP (A T, B E, C H, C Y, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, C A, J P, U S

(71) 出願人 ザ ビコワー インスティテュート フォー メディカル リサーチ
 アメリカ合衆国, ニューヨーク 11030,
 マンハセット, コミュニティ ドライブ
 350
 (72) 発明者 トレーシー, ケビン・ジェイ
 アメリカ合衆国, コネチカット 06870,
 オールド・グリーンウィッチ, ハイビュ
 ー・アベニュー 17
 (74) 代理人 弁理士 津田 肇 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織虚血を治療するための化合物及び組成物

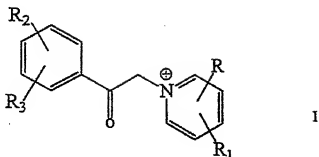
(57) 【要約】

組織虚血、特に発作 (CNS 虚血)、及び心筋虚血と関連する損傷の緩和に保護作用を示す一連の化合物及び医薬組成物が開示される。更に本発明は、虚血によって惹起される組織損傷を処置する方法を提供する。最後に本発明は、3-アミノプロパナールの細胞傷害活性を阻害する化合物を提供することにより、惹起された組織損傷を処置するための方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 式I：

【化1】



【式中、R及びR₁は、独立に水素、スルファミド、カルボキシアミド、シアノ、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルコキシ、エーテル結合若しくはエステル結合を有する直鎖C₁₋₆アルキル若しくは直鎖C₂₋₆アルケニル、トルエニル、COOH、ニトラート、又はハライド（Br、Cl、I、F）であり、ここでR及びR₁の両方が水素であることはできず、R₂及びR₃は、独立に水素、ヒドロキシル、スルファミド、カルボキシアミド、シアノ、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルコキシ、エーテル結合若しくはエステル結合を有する直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル又は直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、トルエニル、COOH、ニトラート、又はハライド（Br、Cl、I、F）である】を有する虚血損傷緩和化合物。

【請求項2】 R及びR₂が、互いに、そしてヘテロ原子に対してメタ位にある、請求項1記載の虚血損傷緩和化合物。

【請求項3】 Rが、COOHである、請求項1記載の虚血損傷緩和化合物。

【請求項4】 R₁が、COOHである、請求項1記載の虚血損傷緩和化合物。

【請求項5】 R₂及びR₃が、両方とも水素である、請求項1記載の虚血損

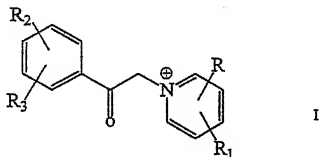
傷緩化合物。

【請求項6】 R及びR₁が、それぞれCOOHであり、そしてR₂及びR₃が、両方とも水素である、請求項1記載の虚血損傷緩化合物。

【請求項7】 化合物が、1-フェナシル-2, 3-ジカルボキシピリジニウムブロミド；1-フェナシル-2, 4-ジカルボキシピリジニウムブロミド；1-フェナシル-2, 5-ジカルボキシピリジニウムブロミド (AP5)；1-フェナシル-2, 6-ジカルボキシピリジニウムブロミド；1-フェナシル-2, 3-ジカルボキシイミドピリジニウムブロミド；1-フェナシル-2, 4-ジカルボキシイミドピリジニウムブロミド；1-フェナシル-2, 5-ジカルボキシイミドピリジニウムブロミド；及び1-フェナシル-2, 6-ジカルボキシイミドピリジニウムブロミドからなる群から選択される、請求項1記載の虚血損傷緩化合物。

【請求項8】 式Iが、

〔化2〕



〔式中、R及びR₁は、独立に水素、スルファミド、カルボキシアミド、シアノ、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルコキシ、エーテル結合若しくはエステル結合を有する直鎖C₁₋₆アルキル若しくは直鎖C₂₋₆アルケニル、トルエニル、COOH、ニトラート、又はハライド (Br、Cl、I、F) であり、ここでR及びR₁の両方が水素であることはできず、R₂及びR₃は、独立に水素、ヒドロキシル、スルファミド、カルボキシアミド、シアノ、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、直鎖若しくは分枝鎖状

のC₁- α アルコキシ、エーテル結合若しくはエステル結合を有する直鎖若しくは分枝鎖状のC₁- α アルキル又は直鎖若しくは分枝鎖状のC₂- α アルケニル、トルエニル、COOH、ニトラート、又はハライド(Br、Cl、I、F)である]である式Iの化合物を、薬学的に許容しうる担体を含む医薬組成物。

【請求項9】 R及びR₁が、互いに、そしてヘテロ原子に対してメタ位にある、請求項8記載の医薬組成物。

【請求項10】 Rが、COOHである、請求項8記載の医薬組成物。

【請求項11】 R₁が、COOHである、請求項8記載の医薬組成物。

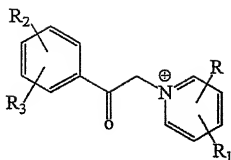
【請求項12】 R₂及びR₃が、両方とも水素である、請求項8記載の医薬組成物。

【請求項13】 R及びR₁が、それぞれCOOHであり、そしてR₂及びR₃が、両方とも水素である、請求項8記載の医薬組成物。

【請求項14】 化合物が、1-フェナシル-2, 3-ジカルボキシピリジニウムブロミド; 1-フェナシル-2, 4-ジカルボキシピリジニウムブロミド; 1-フェナシル-2, 5-ジカルボキシピリジニウムブロミド(AP5); 1-フェナシル-2, 6-ジカルボキシピリジニウムブロミド; 1-フェナシル-2, 3-ジカルボキシイミドピリジニウムブロミド; 1-フェナシル-2, 4-ジカルボキシイミドピリジニウムブロミド; 1-フェナシル-2, 5-ジカルボキシイミドピリジニウムブロミド; 及び1-フェナシル-2, 6-ジカルボキシイミドピリジニウムブロミドからなる群から選択される、請求項8記載の医薬組成物。

【請求項15】 虚血により惹起される組織損傷を阻害する方法であって、式Iが、

【化3】



I

〔式中、R及びR₁は、独立に水素、スルファミド、カルボキシアミド、シアノ、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルコキシ、エーテル結合若しくはエステル結合を有する直鎖C₁₋₆アルキル若しくは直鎖C₂₋₆アルケニル、トルエニル、COOH、ニトラート、又はハライド(Br、Cl、I、F)であり、ここでR及びR₁の両方が水素であることはできず、R₂及びR₃は、独立に水素、ヒドロキシル、スルファミド、カルボキシアミド、シアノ、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルコキシ、エーテル結合若しくはエステル結合を有する直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル又は直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、トルエニル、COOH、ニトラート、又はハライド(Br、Cl、I、F)である〕である式Iの化合物の有効量を投与することを特徴とする方法。

〔請求項16〕 R及びR₁が、互いに、そしてヘテロ原子に対してメタ位にある、請求項15記載の方法。

〔請求項17〕 Rが、COOHである、請求項15記載の方法。

〔請求項18〕 R₁が、COOHである、請求項15記載の方法。

〔請求項19〕 R₂及びR₃が、両方とも水素である、請求項15記載の方法。

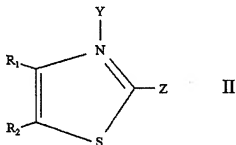
〔請求項20〕 R及びR₁が、それぞれCOOHであり、そしてR₂及びR₃が、両方とも水素である、請求項15記載の方法。

〔請求項21〕 化合物が、1-フェナシル-2, 3-ジカルボキシピリジニウムブロミド；1-フェナシル-2, 4-ジカルボキシピリジニウムブロミド

；1-フェナシル-2，5-ジカルボキシピリジニウムブロミド (AP5)；1-フェナシル-2，6-ジカルボキシピリジニウムブロミド；1-フェナシル-2，3-ジカルボキシイミドピリジニウムブロミド；1-フェナシル-2，4-ジカルボキシイミドピリジニウムブロミド；1-フェナシル-2，5-ジカルボキシイミドピリジニウムブロミド；及び1-フェナシル-2，6-ジカルボキシイミドピリジニウムブロミドからなる群から選択される、請求項15記載の方法。

【請求項22】 虚血によって惹起される組織損傷を阻害する方法であって、チオプロニン、又は式IIが、

【化4】



〔式中、R₁及びR₂は、独立に、水素、ヒドロキシC₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルコキシC₁₋₆アルキルからなる群から選択され、R₃及びR₄は、その環炭素と一緒に芳香族縮合環であることができ、Zは、水素又はアミノ基であり、Yは、水素又は式-CH₂CORの基であり；ここでRは、C₁₋₆アルキル、C₁₋₆アルコキシ、ヒドロキシ、アミノ、アリール、又は-CH₂R₅である（ここで、R₅は、H、C₁₋₆アルキル、C₂₋₆アルケニル、又はC₄₋₆アリールである）〕である式IIの化合物の有効量を投与することを特徴とする方法。

【請求項23】 式IIの化合物が、ハライド (Cl、Br、F、I)、トシラート、メタンスルホナート、又はメシチレンスルホナート塩である、請求項22記載の方法。

【請求項24】 虚血によって惹起される組織損傷を処置する方法であって、3-アミノプロパナールを無毒化する化合物の有効量を投与することを特徴と

する方法。

【請求項25】 虚血の結果生じる組織損傷が、心筋梗塞又は発作として現れる、請求項24記載の方法。

【請求項26】 ポリアミン化合物又は3-アミノプロパナールを試験動物の脳実質にマイクロインジェクションにより投与し、試験化合物又は対照剤を局所又は全身投与し、そして試験動物から得た染色脳切片における細胞傷害を測定することを特徴とする *in vivo*スクリーニングアッセイ。

【請求項27】 培養されたグリア細胞又はニューロン細胞関連細胞系を、約50～約1000 μ Mの濃度で3-アミノプロパナールに曝露し、各種濃度の試験化合物又は対照物質を細胞培養物に加え、約5分～約20時間の期間、細胞培養条件下でインキュベートし、そして細胞生存パーセントを測定することを特徴とする *in vivo*スクリーニングアッセイ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の技術分野

本発明は、組織虚血、特に卒中発作（CNS虚血）、及び心筋虚血に関連する損傷を緩和するのに保護作用を示す、一群の化合物及び医薬組成物を提供する。本発明は、更に傷害、疾病又は発作がもたらす組織損傷、特に虚血によって生じる組織損傷を治療又は予防する方法を提供する。最後に、本発明は、3-アミノプロパナールの細胞傷害活性を阻害又は中和する化合物及び組成物を提供することによって、組織損傷を治療又は予防する方法を提供する。

【0002】

発明の背景

脳虚血、すなわち世界全体の障害及び死亡の主たる原因は、脳内の生存可能細胞を殺す、一連の分子の細胞毒によって媒介される。ポリアミン、スベルミン、スベルミジン及びブトレッシンは、哺乳動物の脳に最も多量に存在する分子類に属していて、虚血性脳損傷の病因に関与している [Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10883-10887, 1994; Harman & Shaw, Br. J. Pharmac. 73:165-174, 1981; Bergeron et al., J. Med. Chem., 39:5257-5266, 1996; Glantz et al., J. Basic. Clin. Physiol. Pharmacol. 7:1-10; Dempsey et al., Neurosurg. 17:635-640; 及び Schmitz et al., Neurosurg. 33:882-888, 1993]。ポリアミン生合成は、脳虚血の発症後に増大するが、それは、ポリアミン生合成経路における枢要な合成酵素である、オルニチンデカルボキシラーゼの虚血伸介誘導のためである。スベルミンは、グルタミン酸伸介細胞傷害の発生に関連しているが、それは、NMDA受容体のNR1サブユニットに結合し、グルタミン酸伸介細胞損傷を増強することができるためである [Traynelis et al., Science 268:873-876, 1995; Traynelis & Cull-Candy, J. Physiol. (Lond.) 433:727-763, 1991; 及び Sullivan et al., Neuron 13:929-936, 1994]。オルニチンデカルボキシラーゼを阻害する実験的治療剤の投与は、卒中発作の実験動物モデルでの虚血性脳損傷の発症を限定する [ref.]。したがって、虚血脳内でのポリアミンの蓄積は、卒中発作の病因に重要な役割を占めている [Kindy et al., J. Cer

eb. Blood Flow Metab., 14:1040-1045, 1994]。

【0003】

脳内スベルミン及びスベルミジン濃度は、脳虚血によって実際に低下する [Paschen, J. Neurochem. 49:35-37, 1987; 及び Paschen, Cerebrovasc. Brain Metab. Rev. 4:59-88, 1992]。組織スベルミン及びスベルミジン濃度の、この観察された低下は、脳内ブトレッシン濃度の上昇を伴う [Paschen, Mol. Chem. Neuropathol. 16:241-271, 1992; Paschen, Cerebrovasc. Brain Metab. Rev. 4:59-88, 1992; Morgan, Bachrach & Heimer, eds. CRC Publications, 203-229, 1989; 及び Paschen et al., Acta Neuropathol. 76:388-394, 1988]。更に、上昇したブトレッシン濃度は、脳細胞死の容積と有意に相関していた。ブトレッシンは、NMDA受容体と相互作用せず、その細胞傷害活性を増強しない。これらの結果の可能な説明は、組織ポリアミノオキシダーゼの活性に依存する、ポリアミンの「相互転換経路」を経由する異化作用にあると思われる [Seiler & Bolkenius, Neurochem. Res. 10:529-544, 1985; Seiler et al., Med. Biol. 59:334-346, 1981; Bolkenius & Seiler, Int. J. Dev. Neurosci. 4:217-224, 1986; 及び Bolkenius et al., Biochim. Biophys. Acta 838:69-76, 1985]。脳その他の哺乳動物組織内に高濃度に存在する、この遍在する酵素は、酸化的脱アミノを通じてスベルミン及びスベルミジンを切断して、最終生成物のブトレッシン及び3-アミノプロパナルを生成する [Seiler & Bolkenius, Neurochem. Res. 10:529-544, 1985; Seiler, in Yu et al., eds. Elsevier Science, 333-344, 1995; Morgan, Essays in Biochemistry 23:82-115, 1987; 及び Houen et al., Acta Chem. Scand. 48:52-60, 1994]。3-アミノプロパナルは、一次内皮細胞、繊維芽細胞、及び形質転換された様々な哺乳動物細胞系に対して細胞傷害性があることで知られている [Bouzyk & Rosiek, Cancer Lett. 39:93-99, 1988; Brunton et al., Toxic. in Vitro 8:337-341, 1994; Gaugas & Dewey, Br. J. Cancer 39:548-557, 1978; Morgan et al., J. Biochem. 236:97-101, 1986; 及び Ferrante et al., J. Immunol. 133:2157-2162, 1984]。3-アミノプロパナルもまた、マウス胚の肢芽でのプログラムされた細胞死のメジエーターとして関与し、いくつかの腫瘍での壊死の発生に寄与すると思われる [Parchment & Pierce

, Cancer Res. 49:6680-6686, 1989; 及びKurihara et al., Neurosurg. 32:372-375, 1993]。アミノグアニジンによるポリアミノオキシダーゼの阻害は、スベルミン添加後の細胞培養体における3-アミノプロパナールの発生を遮断し、その後の細胞傷害を防止した[Ferrante et al., J. Immunol. 133:2157-2162, 1984; Morgan, Essays in Biochemistry 23:82-115, 1987; 及びParchment & Pierce, Cancer Res. 49:6680-6686, 1989]。モルベースでは、細胞に対する3-アミノプロパナールのLD₅₀濃度は、グルタミン酸の細胞傷害性に類似する。対照的に、ブトレッシンは、ミリモルの範囲でさえ、細胞に対して細胞傷害性ではないが、ポリアミンの酸化を通じての生成の速度は、直接的に細胞傷害性であるアルデヒド、すなわち3-アミノプロパナールの形成と直接的に相関する。

【0004】

加えて、グリア細胞については本明細書で初めて報告されるデータでは、3-アミノプロパナールは、インターロイキン-1 β 変換酵素(ICE)依存シグナリング経路の活性化によって、アポトーシスに介在するのに対し、ニューロンでは、壊死性細胞死を生じる。

【0005】

脳虚血(卒中発作)は、脳のある部域への血流の突然の中断から生じる、衰弱性状態であって、脳組織の欠損を招く。梗塞域でのニューロン死によって生じた神経学的欠損を逆転させる、有効な治療法は皆無である。卒中発作は、米国では、毎年約550,000件が発生する、大きな公衆衛生上の問題である。脳虚血は、すべての年齢群の個人を苦しめるが、発生率は、45歳以上では10歳ごとに倍化し、75歳以上の個人の集団では、年間1~2%に達する。患者が生存したならば、コミュニケーションし、歩行し、視認し、協調し、論理的に行動する能力の欠損を伴った重大な障害が生じる可能性がある。標準的な治療法は、しばしば、脳梗塞を予防するのに無効果であり、心血管及び呼吸機能を支援し、脳内圧を制御し、卒中発作の再発を予防することにあるとされる。また、血栓によって生じた卒中発作に対してのみ、血栓を溶解するよう意図された一群のプロテアーゼという酵素が存在し、脳虚血に潜在的に役立つにすぎないが、(出血とは対照的に)これらの薬剤は、多少の血流を限定された状況で回復するよう機能するにす

ぎない。

【0006】

脳梗塞（卒中発作）の進展の際は、甚だしく虚血した組織のコアが、急速かつ不可逆的に損傷するようになる。周囲の領域（「虚血性半影部」と呼ばれる）の細胞性損傷は、より緩やかに進行する。

【0007】

虚血発作の後、組織破壊の過程は、数時間、更には数日で完了しないことがある [Kirino et al., *Acta Neuropathol.* 64:139-147, 1984; 及び Petito et al., *Neurology* 37:1281-1286, 1987]。虚血組織を梗塞へと進行させないようにするための、干渉の好機の一時的な窓口 (window) が存在する。ヒトでは、この窓口は、虚血の開始後約2～4時間にわたり、その時間の後は、効果は急速に低下すると考えられている [Ginsburg & Pulsinelli, *Ann. Neurol.* 36:553-554, 1994]。治療窓口の間は、治療の神経防護の標的は、虚血性コアの周囲のある容積の脳組織である、虚血性半影部であって、減少した血流を受け、弱まっているが、生存する可能性がある組織を含む。研究は、虚血発症後の初めの数時間以内の細胞死を生じる、重要な細胞傷害性メジエーターを特定した。

【0008】

正常な脳の数多くの分子的物質はもとより、循環によって送達される外来因子も、虚血の際の細胞の細胞傷害性の発生に寄与している。これらは、グルタミン酸塩、アスパラギン酸塩、酸化窒素、カルシウム、フリーラジカル、亜鉛、サイトカイン類、アラキドン酸代謝物、及び前進性グリコシル化終末産物 (advanced glycation and products) (AGE) を包含するが、これらに限定されない。前進性グリコシル化終末産物は、糖尿病併発症の病因に関与した、一群のタンパク質修飾付加物である。AGEは、虚血性半影部では脳毒性であることが見出された [Zimmerman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3744-3748, 1995]。加えて、AGE架橋結合反応の低分子阻害剤であるアミノグアニジンが、病巣性脳虚血の際のAGEの脳毒性を有効に排除した [Zimmerman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3744-3748, 1995]。アミノグアニジンは、外因性AGEとは無関係に、正常な、糖尿病でない動物における病巣性虚血の際に、脳保護

的であることも見出された [Zimmerman et al., Surg. Forum. 45:600-603, 1994]。更に、アミノグアニジンは、病巣性卒中発作のモデルにおいて、病巣性脳虚血の発症後2時間以内に投与したとき、脳保護を示した [Cockcroft et al., Stroke 27:1393-1398, 1996]。作用機序は、ポリアミノオキシダーゼ (PAO)、すなわち生体源アミンの酸化によって有毒で反応性に富むアルデヒド代謝物を生成する酵素の阻害であると考えられた。

[0009]

減少した血流によって開始される、細胞傷害性のカスケードには、ATP濃度の降下、及び酸化的リン酸化の低下が後続する。その結果、膜電位が低下して、興奮毒性と呼ばれる過程での、 K^+ 、及び過剰量のグルタミン酸塩などの興奮性アミノ酸 (EAA) の放出がもたらされる。次いで、これが、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA)、アミノ-3-ヒドロキシ-5-メチル-4-イソオキサゾール-4-プロピオン酸 (AMPA)、カイニン酸 (KA)、及び1S, 3R-trans-1-アミノシクロペンチル-1, 3-ジカルボン酸 (trans-ACPD) 受容体を過剰活性化することになる [Faroqui & Horrocks, Brain Res. 16:171-191, 1991]。

[0010]

グルタミン酸塩の増加は、主として興奮性アミノ酸受容体チャネルの活性化による、過剰な Ca^{2+} 流入はもとより、 Na^+ 、 Cl^- 及び水の、脱分極が媒介する流入の結果としての、膨潤、及び浸透圧溶解をもたらす [Faroqui & Horrocks, Brain Res. 16:171-191, 1991]。細胞内 Ca^{2+} のこの増加は、ホスホリパーゼ、リパーゼ、プロテアーゼ及びタンパク質キナーゼを活性化して、リン脂質膜の結果的損壊、細胞骨格の変化、アラキドン酸の放出、及びフリーラジカルカスケードの増強へと導く [Manfred et al., Biochem. Pharm. 50:1-16, 1995]。NMDA受容体のその他のモジュレーターは、 Zn^{2+} 、ヒスタミン、一定の神経活性ステロイド、アラキドン酸、ポリアミン及びプロトン又はpHを包含する [Collinridge & Lester, Pharmacol. Rev. 74:143-210, 1989; 及びMcBain & Meyer, Physiol. Rev. 74:723-760, 1994]。その上、NMDA受容体の拮抗剤である、MK-801が、脳虚血の動物モデルでは神経保護効果を発揮することができる [

Olney et al., J. Neurosci. 9:1701-1704, 1989)。

【0011】

虚血は、反応性酸素種 (ROS) の形成、脂質過酸化の活性化、及び内因性抗酸化剤であるアスコルビン酸、グルタチオン、ユビキノン及び α -トコフェロールの脳組織内での減少も招く。シクロオキシゲナーゼ及びリポキシゲナーゼが触媒する、ミトコンドリアの呼吸鎖及び反応系列は、スーパーオキシドアニオン (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、及びヒドロキシル基 (OH^\cdot) の重要な生成部位である。活性化された酸素種は、カテコールアミンの自己酸化の際、及びキサンチン反応でも形成される。

【0012】

酸化窒素 (NO) は、脳虚血における組織傷害のもう一つのメジエーターである。NO濃度は、中大脳動脈 (MCA) 閉塞後の脳では、ポルフィリン微量センサーアッセイによれば約 10 nM から $2 \mu M$ へと、急激に上昇する [Beckman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1620, 1990]。

【0013】

虚血性組織損傷のこれら疑われるその他のメジエーターに加え、3-アミノプロパノールは、哺乳動物細胞内のPAOによる、ポリアミンであるスベルミン及びスベルミジンの酸化的切断の酵素による副生成物である [Holttä, Biochemistry 16:91-100, 1997]。スベルミン及びスベルミジンとのPAO活性の同時培養の結果生じる細胞傷害は、アミノグアニジンによって排除されている [Gahl et al., Chemobiological Interactions 22:91-98, 1978; 及びHenle et al., Cancer Res. 46:175-182, 1986]。3-アミノプロパノールは、マウス胚の肢芽にプログラムされた細胞死を生じること [Parchment et al., Cancer Res. Arch. 49:6680-6686, 1989]、及び固型腫瘍の壊死にも関与している。

【0014】

これらのデータは、卒中発作の際に経験される、組織虚血の治療、特に虚血性半影部に対する損傷の緩和ばかりでなく、筋組織 (例えば平滑筋及び心筋) のような非ニューロン性組織にも治療の効用を有すると思われる、PAO活性の阻害剤を見出すための、当技術における必要性をもたらす。

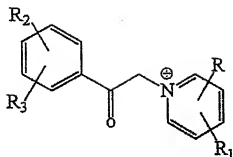
【0015】

発明の概要

本発明は、式 I :

【0016】

【化5】



I

【0017】

〔式中、R及びR₁は、独立に水素、スルファミド、カルボキシアミド、シアノ、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルコキシ、エーテル結合若しくはエステル結合を有する直鎖C₁₋₆アルキル若しくは直鎖C₂₋₆アルケニル、トルエニル、COOH、ニトラート、又はハライド（Br、Cl、I、F）であり、ここでR及びR₂の両方が水素であることはできず、R₂及びR₃は、独立に水素、ヒドロキシ、スルファミド、カルボキシアミド、シアノ、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルコキシ、エーテル結合若しくはエステル結合を有する直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル又は直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、トルエニル、COOH、ニトラート、又はハライド（Br、Cl、I、F）である〕を有する発作損傷緩和化合物を提供する。

【0018】

好ましくは、R及びR₁は、互いに、そしてヘテロ原子に対してメタ位にある。好ましくは、Rは、COOHである。好ましくは、R₁は、COOHである。好ましくは、R₂及びR₃は、両方とも水素である。最も好ましくは、R及びR₁は、

は、それぞれCOOHであり、そしてR₂及びR₃は、両方とも水素である。

【0019】

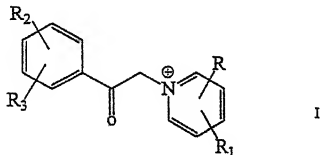
式1の好ましい化合物は、例えば1-フェナシル-2, 3-ジカルボキシビリジニウムブロミド；1-フェナシル-2, 4-ジカルボキシビリジニウムブロミド；1-フェナシル-2, 5-ジカルボキシビリジニウムブロミド (AP5)；1-フェナシル-2, 6-ジカルボキシビリジニウムブロミド；1-フェナシル-2, 3-ジカルボキシイミドビリジニウムブロミド；1-フェナシル-2, 4-ジカルボキシイミドビリジニウムブロミド；1-フェナシル-2, 5-ジカルボキシイミドビリジニウムブロミド；及び1-フェナシル-2, 6-ジカルボキシイミドビリジニウムブロミドを包含する。

【0020】

本発明は、式Iが、

【0021】

【化6】



【0022】

〔式中、R及びR₁は、独立に水素、スルファミド、カルボキシアミド、シアノ、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルコキシ、エーテル結合若しくはエステル結合を有する直鎖C₁₋₆アルキル若しくは直鎖C₂₋₆アルケニル、トルエニル、COOH、ニトラート、又はハライド (Br、Cl、I、F) であり、ここでR及びR₁の両方が水素であることはできず、R₂及びR₃は、独立に水素、ヒドロキシル、スルファミド、カルボキシアミド、シアノ、直鎖若しくは分枝鎖状のC

1-6アルキル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルコキシ、エーテル結合若しくはエステル結合を有する直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル又は直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、トルエニル、COOH、ニトラート、又はハライド (Br、Cl、I、F) である] である式Iの化合物を、薬学的に許容しうる担体を含む医薬組成物を提供する。

【0023】

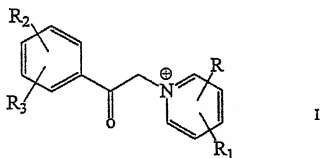
好ましくは、R及びR₁は、互いに、そしてヘテロ原子に対してメタ位にある。好ましくは、Rは、COOHである。好ましくは、R₁は、COOHである。好ましくは、R₂及びR₃は、両方とも水素である。最も好ましくは、R及びR₁は、それぞれCOOHであり、そしてR₂及びR₃は、両方とも水素である。

【0024】

更に本発明は、組織虚血を処置して虚血損傷を緩和する方法であって、式Iが

【0025】

【化7】



【0026】

【式中、R及びR₁は、独立に水素、スルファミド、カルボキシアミド、シアノ、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルキル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₂₋₆アルケニル、直鎖若しくは分枝鎖状のC₁₋₆アルコキシ、エーテル結合若しくはエステル結合を有する直鎖C₁₋₆アルキル若しくは直鎖C₂₋₆アルケニル、トルエニル、COOH、ニトラート、又はハライド (Br、Cl、I、F) であり、ここでR及びR₁の両方が水素であることはできず、R₂及びR₃は、独立に水素、ヒドロ

キシル、スルファミド、カルボキシアミド、シアノ、直鎖若しくは分枝鎖状の C_{1-6} アルキル、直鎖若しくは分枝鎖状の C_{2-6} アルケニル、直鎖若しくは分枝鎖状の C_{1-6} アルコキシ、エーテル結合若しくはエステル結合を有する直鎖若しくは分枝鎖状の C_{1-6} アルキル又は直鎖若しくは分枝鎖状の C_{2-6} アルケニル、トルエニル、 $COOH$ 、ニトラート、又はハライド (Br 、 Cl 、 I 、 F) である] である式 I の化合物の有効量を投与することを特徴とする方法を提供する。

【0027】

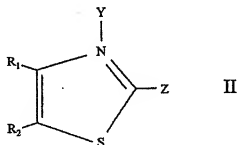
好ましくは、 R 及び R_1 は、互いに、そしてヘテロ原子に対してメタ位にある。好ましくは、 R は、 $COOH$ である。好ましくは、 R_1 は、 $COOH$ である。好ましくは、 R_2 及び R_3 は、両方とも水素である。最も好ましくは、 R 及び R_1 は、それぞれ $COOH$ であり、そして R_2 及び R_3 は、両方とも水素である。

【0028】

更に本発明は、組織虚血を処置して虚血損傷を緩和する方法であって、チオプロニン、又は式 II が、

【0029】

【化8】



【0030】

[式中、 R_1 及び R_2 は、独立に、水素、ヒドロキシ C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ C_{1-6} アルキルからなる群から選択され、 R_1 及び R_2 は、その環炭素と一緒に、芳香族縮合環であることができ、 Z は、水素又はアミノ基であり、 Y は、水素又は式 $-CH_2COR$ の基であり、ここで R は、 C_{1-6} アルキル、 C_{1-6} アルコキシ、ヒドロキシ、アミノ、アリール、又は $-CH_2R_3$ である (ここで、 R

は、H、C₁₋₆-アルキル、C₂₋₆-アルケニル、又はC₆₋₆-アリールである)] である式IIの化合物の有効量を投与することを特徴とする方法を提供する。好ましくは、式IIの化合物は、ハライド (Cl、Br、F又はI)、トシラート、メタンスルホナート、又はメシチレンスルホナート塩である。

【0031】

更に本発明は、組織損傷を阻害する方法であって、3-アミノプロパナールの細胞傷害活性を阻害又は中和する化合物の有効量を投与することを特徴とする方法を提供する。好ましくは、組織虚血の結果生じる疾患は、心筋梗塞又は発作である。

【0032】

発明の詳細な説明

本発明は、誘導された病理性虚血後の脳損傷が、脳のポリアミンオキシダーゼ活性の誘導によって仲介されることが見出された、一連の実験から生まれた。その上、細胞傷害性最終生成物である3-アミノプロパナールが、虚血脳内に、ニューロン及びグリア細胞には致死性である濃度で蓄積した。これらのデータは、ラットでは、構造的に明確な医薬化合物によるポリアミンオキシダーゼ活性の阻害が、3-アミノプロパナールの形成を防止し、恒久的な大脳動脈閉塞後の、脳損傷の発症に対する有意な保護を与えることを更に立証した。最後に、3-アミノプロパナールと反応できる可能性を有するある種の化合物は、虚血後の組織損傷の程度を限定するのに有効であるというデータが示される。

【0033】

3-アミノプロパナール

密接に関連する4系列の証拠が、脳虚血における細胞及び組織損傷の細胞傷害メジュレーターとしての3-アミノプロパナールの役割を裏付ける。第一に、脳虚血は、ポリアミンオキシダーゼ活性の初期誘導を仲介する。第二に、細胞傷害性酵素生成物である3-アミノプロパナールは、脳虚血に対する初期応答の際に蓄積するが(図2)、正常に灌流された対照では産生されない。第三に、虚血脳における3-アミノプロパナール産生は、重大な細胞変性の開始前に増大して、進行性細胞死の期間中に、組織3-アミノプロパナール濃度は、更に上昇する。第

四に、3-アミノプロパナールは、グリア細胞でのICE依存性機序を介してのアポトーシス、及びニューロンでの壊死を活性化する、強力な細胞毒である。考え合わせると、これらのデータは、ブトレッシン、すなわち終端ポリアミン酸化の安定的な最終生成物の脳内濃度と、梗塞容積との間の相関関係についての説明を与える [Dempsey et al., Neurosurg. 17:635-640, 1985; Traynelis et al., J. Physiol. (London) 433:727-763, 1991; Gilad et al., Mol. Chem. Neuropathol. 18:197-210, 1993]。ポリアミノオキシダーゼによるスベルミン及びスベルミジンの異化作用は、安定的な無害の最終生成物 (ブトレッシン) と、強力な細胞毒 (3-アミノプロパナール) との双方を生成する。後者の生成物は、細胞死を仲介し、前者は、損傷の程度と関連し合って蓄積する。

【0034】

従来の所見は、ポリアミンは、ニューロン培養物におけるアポトーシスを防止できるか [Harada & Sugimoto, Brain Res. 753:251-259, 1997; 及び Xie et al., Exp. Cell Res. 230:386-392, 1997]、又はグルタミン酸に仲介される細胞の細胞傷害性を増幅できることを示唆する [Pegg et al., Biochem. Soc. Trans. 22:846-852, 1994]。虚血域での細胞生存は、ポリアミン類の直接効果と、それらの代謝物である3-アミノプロパナールの細胞傷害性効果との均衡に死活的に依存している可能性が高い。3-アミノプロパナールと3-アセトアミドプロパナールとの双方が、細胞傷害性及びアポトーシスの公知のメジエーターであるアクロレインをin vivoで生成できるか否かに関しては、多少の論争が存在している [Li et al., Toxicol. Appl. Pharmacol. 145:331-339, 1997; 及び Fernandez et al., Br. J. Cancer 72:1194-1199, 1995]。したがって、ポリアミン酸化のいくつかの生成物は、3-アミノプロパナールの細胞傷害性を更に促進し得る可能性が高い。理論に捉われずに考え合わせると、これらの所見は、虚血の際のポリアミン酸化の増大が有害であるとの仮説に信用性を更に付加する。

理論に捉われずに、これらのデータは、脳虚血の際の脳細胞死の下記の機序を示唆する：甚だしく低酸素のコアにおける死んだ、及び死につつある細胞は、細胞内スベルミン及びスベルミジンの蓄えを放出し、それがポリアミノオキシダーゼによって異化される。その結果としての3-アミノプロパナールの生成は、周

囲のグリア細胞にアポトーシスを、ニューロンに壊死を引き起こし、次いで、これらがポリアミンオキシダーゼの基質としてのスベルミン及びスベルミジンを更に放出する。この細胞傷害の機序は、虚血コアを囲む、生存の可能性がある、より大きな容積の細胞を巻き込むように広がる。興奮性アミノ酸、活性化された酸素種、酸化窒素、TNF、IL-1、IL-6及び血小板活性化因子と連携して [Meistrell III et al., SHOCK 8:341-348, 1997; Zhang et al., Stroke 27:317-323, 1996; Coyle & Puttfarcken, Science 262:689-695, 1993; Rothwell & Strijbos, Int. J. Dev. Neurosci. 13:179-185, 1995; Irikura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6823-6827, 1995; Rothwell & Reiton, Cerebrovasc. Brain Metab. Rev. 5:178-198, 1993; Taupin et al., J. Neuroimmunol. 42:177-185, 1993; Saito et al., Neurosci. Lett. 206:149-152, 1996; Choi, J. Neurobiol. 23:1261-1276, 1992; 及びMontague et al., Science 263:973-976, 1994]、3-アミノプロパナールは、脳虚血の細胞傷害性カスケードにおける近位メジエーターとしての位置を占めている可能性が高い。従来所見は、ICE (IL-1 β 変換酵素)の阻害は、脳虚血の際のアポトーシスの発症に対して保護作用を示すことに注目している [Friedlander et al., J. Exp. Med. 185:933-940, 1997; Gillardon et al., Brain Res. Mol. Brain Res. 50:16-22, 1997; 及びHara et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. 17:370-375, 1997]。脳虚血の際のアポトーシスに対する刺激は未知であるため、3-アミノプロパナールの近い役割を示唆するのが合理的である。更に、TNF合成は、脳虚血の初めの12時間にアップレギュレートされるが、このサイトカインは、脳損傷のその後の発症に関与することが以前に報告された [Meistrell III et al., SHOCK 8:341-348, 1997]。スベルミンは、ヒト末梢血単核細胞におけるTNF合成の直接阻害剤である [Zhang et al., J. Exp. Med. 185:1-10, 1997]。その上、脳虚血の際に低下するスベルミン濃度の役割は、説明されておらず、報告されていない。

[0035]

中枢投与された3-アミノプロパナールは、脳内TNF合成を直接刺激した(データは実施例中に示さず)。これらのデータは、卒中発作の病因における3-

アミノプロパナールの近い役割の追加的証拠を与える。

【0036】

3-アミノプロパナールの初期の生成、及び強力な細胞傷害性は、虚血メジャーカスケードにおけるこのアルデヒドの近い役割を規定する。したがって、ポリアミン酸化は、細胞に対する細胞傷害性に寄与し、これらのデータは、他の細胞傷害性因子の潜在的な役割に矛盾しない。ポリアミン及びポリアミノキシダーゼは、すべての哺乳動物組織に存在する [Seiler, *Biochimica et Biophysica Acta* 615:480-488, 1980]。

【0037】

表1は、3-アミノプロパナールとの接触後の、細胞生存率の経時的研究を示す。グリア細胞又はニューロン細胞を、示された時間、 LD_{50} の濃度の3-アミノプロパナール ($750 \mu M$) に接触させた後、培地を新鮮なOPTI-MEM (培地) に代えて、全インキュベーション時間を20時間とした。細胞生存率は、MTTアッセイによって決定した (示したデータは、平均±標準誤差である)。

【0038】

【表1】

細胞生存率 (% 生存)

時間(min)	グリア細胞(HTB 14)	ニューロン(HTB 11)
5	96±3	29±6
60	92±1	13±4
120	78±7	6±2
1200	5±5	3±1

【0039】

これらのデータは、ポリアミノキシダーゼで誘導された3-アミノプロパナールは、治療によって調節することができる、脳虚血の脳損傷性続発症のメジャーであるとの意見を裏付ける。脳ポリアミノキシダーゼ活性は、脳ホモジネート中で ($15.8 \pm 0.9 \text{ nmol/時間/mgタンパク質}$)、虚血の開始後2時間以内に、正常に灌流した対側性の側から調製したホモジネートに比して (7.

4 ± 0.5 nmol/時間/mgタンパク質)、有意に上昇した ($P < 0.05$)。ポリアミノオキシダーゼの主要異化生成物は、ブトレッシン及び3-アミノプロパナールである。3-アミノプロパナールは、強力な細胞傷害であるが、3-アミノプロパナールが脳虚血の際に生成されるか否かについては、基本的な情報が従来は欠けていた。3-アミノプロパナールは、ラットにおける恒久的脳虚血後2時間以内に、虚血脳内に蓄積したが、正常に灌流した脳では、蓄積しなかった。

[0040]

3-アミノプロパナールの細胞傷害性濃度 ($750 \mu\text{M}$) は、有意な脳細胞損傷の開始前に達成され、時間依存的な方式で上昇した。3-アミノプロパナール濃度の上昇は、進行性のニューロン及びグリア細胞の死の発症に付随して生じた。3-アミノプロパナールに接触させたグリア細胞培養体は、アポトーシスを生じた ($\text{LD}_{50} = 275 \mu\text{M}$) のに対し、ニューロンは、壊死性機序によって殺された ($\text{LD}_{50} = 90 \mu\text{M}$)。テトラペプチドICE阻害剤 (Ac-YVAD-OMK) は、グリア細胞における3-アミノプロパナール仲介アポトーシスを防止した。最後に、ポリアミノオキシダーゼの、構造的に区別される2種類の阻害剤 (アミノグアニジン及びグクロキシン) のラットへの投与は、脳のポリアミノオキシダーゼ活性を低下させ、3-アミノプロパナールの生成を防止し、*in vivo*での虚血脳の損傷の発症に対して有意に保護を示した。考え合わせると、これらの結果は、ポリアミノオキシダーゼで誘導された3-アミノプロパナールは、治療によって調節することができる、脳虚血の脳損傷性続発症のメジエーターであることを示す。

[0041]

合成、化合物及び配合物

式(I)の化合物は、R、R₁及びR₂の側鎖に発生し得る、不斉炭素を有することがあり；光学異性体が、式(II)の化合物のR、R₁及びR₂の側鎖に同様に発生し得る。これらの化合物のいずれのラセミ混合物の異性体も、当業者に公知の方法によって分離することができ、こうして精製かつ単離された異性体調製物は、当業者に公知であるか、又は本明細書に教示の方法によって、そのような異性体調製物が (対応するラセミ混合物とは対照的に)、より望ましいか、例えば

、本発明の方法に用いるのに、より毒性が低いか、又はより効能が高いかを決定するために、試験することができる。

【0042】

本発明の化合物、組成物及び治療方法は、様々な設定において、特に状況が、3-アミノプロパナールの放出、及び細胞損傷を拡大する細胞傷害性としてのその役割を伴うと理解され得る際に、組織壊死及び細胞死を防止又は阻害するのに用いることができる。そのような追加的指示は、「無害の傍観者」である細胞死を阻害する必要性を一般的に有する。換言すれば、本発明の化合物、組成物及び方法は、致命的に損傷した、生存不能なコアから潜在的に生存可能である周囲又は半影帯域へと細胞死が拡大するのを防止するのに、特に効用がある。コアでの最初の損傷は、様々な原因のいずれによってもよく（例えば、虚血、塞栓症、血栓症、低循環、傷害、外傷、疾病、熱、低温、化学的接触、外科手術、内因性、環境性又は治療用の細胞傷害との接触、放射線、壊死、アポトーシス等々）；本発明の化合物、組成物及び方法は、そうして、生存不能なコアに隣接する組織での細胞損傷及び細胞死を防止又は限定するのに効用があると思われる。機序に関する解釈に含蓄されるいかなる限定も容認せずに、本発明の化合物、組成物及び方法は、細胞損傷が開始部位から外へと広がる際に、コア及び半影部で放出されるポリアミンの代謝から自然に発生する細胞傷害である、3-アミノプロパナールの細胞傷害活性に対する分子的干渉、及びその中和によって、そのような多岐にわたる設定において機能すると考えられる。そのような場合のそれぞれに、本発明の化合物、組成物及び方法は、損傷を開始する部位に副次的であるか、又は隣接する組織損傷を限定するのに、成功裡に用い得る。

【0043】

式(I)の化合物は、下記の手順に従って合成することができる。N-フェニルアシルピリジニウムブロミドの合成のための一般的手順：エタノール50 ml中のピリジン（1.589、20.0 mmol）及びプロモアセトフェノン（4.009、20.0 mmol）の溶液を、6時間還流した。反応の進行は、酢酸エチル：メタノール：水（4：2：1及び1.0%アンモニア）の混合物を展開溶媒として用いるTLCによって追跡した。反応混合物を冷却すると、生成物が、白色沈澱とし

で溶液から析出し、これを濾過し、エタノールから白色針状結晶（融点：216 . 4 ~ 220℃）として、97%の収率で再結晶させた。新規生成物のそれ以上の特徴付けは、NMR及び質量分光測定を用いて実施した。

【0044】

式2の化合物は、例えば米国特許第5,656,261号に記載されており、その開示は本明細書に参考として組み込まれる。そのような化合物は、例えば3-アミノ-チアゾリウムメシチレンスルホナート；2,3-ジアミノ-チアゾリウムメシチレンスルホナート；3-(2-メトキシ-2-オキシエチル)-4,5-ジメチルチアゾリウムブロミド；3-(2-メトキシ-2-オキシエチル)-4-メチルチアゾリウムブロミド；3-(2-フェニル-2-オキシエチル)-4-メチルチアゾリウムブロミド；3-(2-フェニル-2-オキシエチル)-4,5-ジメチルチアゾリウムブロミド；3-アミノ-4-メチル-チアゾリウムメシチレンスルホナート；3-(2-メトキシ-2-オキシエチル)-5-メチル-チアゾリウムブロミド；3-(2-フェニル-2-オキシエチル)-5-メチル-チアゾリウムブロミド；3-(2-[4¹-プロモフェニル]-2-オキシエチル)-チアゾリウムブロミド；3-(2-[4¹-プロモフェニル]-2-オキシエチル)-4-メチル-チアゾリウムブロミド；3-(2-[4¹-プロモフェニル]-2-オキシエチル)-5-メチル-チアゾリウムブロミド；3-(2-[4¹-プロモフェニル]-2-オキシエチル)-4,5-ジメチルチアゾリウムブロミド；3-(2-メトキシ-2-オキシエチル)-4-メチル-5-(2-ヒドロキシエチル)-チアゾリウムブロミド；3-(2-フェニル-2-オキシエチル)-4-メチル-5-(2-ヒドロキシエチル)-チアゾリウムブロミド；3-(2-[4¹-プロモフェニル]-2-オキシエチル)-4-メチル-5-(2-ヒドロキシエチル)-チアゾリウムブロミド；3,4-ジメチル-5-(2-ヒドロキシエチル)-チアゾリウムヨージド；3-エチル-5-(2-ヒドロキシエチル)-4-メチルチアゾリウムブロミド；3-ベンジル-5-(2-ヒドロキシエチル)-4-メチルチアゾリウムクロリド；3-(2-メトキシ-2-オキシエチル)-ベンゾチアゾリウムブロミド；3-(2-フェニル-2-オキシエチル)-ベンゾチアゾリウムブロミド；3-(2-[4¹

-ブロモフェニル] - 2-オキシエチル) -ベンゾチアゾリウムブロミド; 3
 - (カルボキシメチル) -ベンゾチアゾリウムブロミド; 2, 3-ジアミノ-ベン
 ゾチアゾリウムメシチレンスルホナート; 3- (2-アミノ-2-オキシエチ
 ル) -チアゾリウムブロミド; 3- (2-アミノ-2-オキシエチル) -4-メ
 チルチアゾリウムブロミド; 3- (2-アミノ-2-オキシエチル) -5-メ
 チルチアゾリウムブロミド; 3- (2-アミノ-2-オキシエチル) -4, 5
 -ジメチルチアゾリウムブロミド; 3- (2-アミノ-2-オキシエチル) -
 ベンゾチアゾリウムブロミド; 3- (2-アミノ-2-オキシエチル) -4-メ
 チル-5- (2-ヒドロキシエチル) チアゾリウムブロミド; 3-アミノ-5-
 (2-ヒドロキシエチル) -4-メチルチアゾリウムメシチレンスルホナート
 ; 3- (2-メチル-2-オキシエチル) チアゾリウムクロリド; 3-アミノ-
 4-メチル-5- (2-アセトキシエチル) チアゾリウムメシチレンスルホナ
 ト; 3- (2-フェニル-2-オキシエチル) チアゾリウムブロミド; 3- (2
 -メトキシ-2-オキシエチル) -4-メチル-5- (2-アセトキシエチル)
 チアゾリウムブロミド; 3- (2-アミノ-2-オキシエチル) -4-メチル-
 5- (2-アセトキシエチル) チアゾリウムブロミド; 2-アミノ-3- (2-
 メトキシ-2-オキシエチル) チアゾリウムブロミド; 2-アミノ-3- (2-
 メトキシ-2-オキシエチル) ベンゾチアゾリウムブロミド; 2-アミノ-3-
 (2-アミノ-2-オキシエチル) チアゾリウムブロミド; 2-アミノ-3- (2-
 アミノ-2-オキシエチル) ベンゾチアゾリウムブロミド; 3- [2- (4
 ' -メトキシフェニル) -2-オキシエチル] -チアゾリウムブロミド; 3- [2- (2'
 , 4' -ジメトキシフェニル) -2-オキシエチル] -チアゾリ
 ニウムブロミド; 3- [2- (4' -フルオロフェニル-2-オキシエチル) -チ
 アゾリニウムブロミド; 3- [2- (2' , 4' -ジフルオロフェニル) -2-
 オキシエチル] -チアゾリニウムブロミド; 3- [2- (4' -ジエチルアミノ
 フェニル) -2-オキシエチル] -チアゾリニウムブロミド; 3-プロパルギル
 -チアゾリウムブロミド; 3-プロパルギル-4-メチルチアゾリウムブロミド
 ; 3-プロパルギル-5-メチルチアゾリウムブロミド; 3-プロパルギル-4
 , 5-ジメチルチアゾリウムブロミド; 3-プロパルギル-4-メチル-5- (

2-ヒドロキシエチル) -チアゾリウムブロミド; 3-(2-[3'-メトキシフェニル]-2-オキシエチル) -チアゾリウムブロミド; 3-(2-[3'-メトキシフェニル]-2-オキシエチル) -4-メチル-5-(2'-ヒドロキシエチル) -チアゾリウムブロミド; 3-(2-[3'-メトキシフェニル]-2-オキシエチル) -ベンゾチアゾリウムブロミド; 2, 3-ジアミノ-4-クロロベンゾチアゾリウムメシチレンスルホナート; 2, 3-ジアミノ-4-メチル-チアゾリウムメシチレンスルホナート; 3-アミノ-4-メチル-5-ビニル-チアゾリウムメシチレンスルホナート; 2, 3-ジアミノ-6-クロロベンゾチアゾリウムメシチレンスルホナート; 2, 6-ジアミノ-ベンゾチアゾールジヒドロクロリド; 2, 6-ジアミノ-3-[2-(4'-メトキシフェニル)-2-オキシエチル] ベンゾチアゾリウムブロミド; 2, 6-ジアミノ-3-[2-(3'-メトキシフェニル)-2-オキシエチル] ベンゾチアゾリウムブロミド; 2, 6-ジアミノ-3-[2-(4'-ジエチルアミノフェニル)-2-オキシエチル] ベンゾチアゾリウムブロミド; 2, 6-ジアミノ-3-[2-(4'-エプロモフェニル)-2-オキシエチル] ベンゾチアゾリウムブロミド; 2, 6-ジアミノ-3-[2-(2-フェニル-2-オキシエチル) ベンゾチアゾリウムブロミド; 2, 6-ジアミノ-3-[2-(4'-フルオロフェニル)-2-オキシエチル] ベンゾチアゾリウムブロミド; 3-アセトアミド-4-メチル-5-チアゾリル-エチルアセタートメシチレンスルホナート; 2, 3-ジアミノ-5-メチルチアゾリウムメシチレンスルホナート; 3-[2-(2'-ナフチル)-2-オキシエチル]-4-メチル-5-(2'-ヒドロキシエチル) -チアゾリウムブロミド; 3-[2-(3', 5'-ジ-tert-ブチル-4'-ヒドロキシフェニル)-2-オキシエチル]-4-メチル-5-(2'-ヒドロキシエチル) -チアゾリウムブロミド; 3-[2-(2', 6'-ジクロロフェニルアミノ)-2-オキシエチル]-4-メチル-5-(2'-ヒドロキシエチル) -チアゾリウムブロミド; 3'[2-ジブチルアミノ-2-オキシエチル]-4-メチル-5-(2'-ヒドロキシエチル) -チアゾリウムブロミド; 3-[2, 4'-カルボエトキシアニリノ)-2-オキシエチル]-4-メチル-5-(2'-ヒドロキシエチル) -チアゾリウムブロミド; 3-[2-(2', 6'-ジイン

ル) - 2-オキシエチル] - 4-メチル-5- (2'-ヒドロキシエチル) - チアゾリニウムブロミド; 3- (2-フェニル-2-オキシエチル) - 4-メチル-5-ビニル-チアゾリニウムブロミド; 3- [2- (3', 5'-tert-ブチル-4'-ヒドロキシフェニル) - 2-オキシエチル] - 4-メチル-5-ビニル-チアゾリニウムブロミド; 3- (2-tert-ブチル-2-オキシエチル) - チアゾリニウムブロミド; 3- (2-tert-ブチル-2-オキシエチル) - 4-メチル-5- (2'-ヒドロキシエチル) - チアゾリニウムブロミド; 3- (3'-メトキシベンジル) - 4-メチル-5- (2'-ヒドロキシエチル) - チアゾリニウムクロリド; 3- (2', 6'-ジクロロベンジル) - 4-メチル-5- (2'-ヒドロキシエチル) - チアゾリニウムクロリド; 3- (2'-ニトロベンジル) - 4-メチル-5- (2'-ヒドロキシエチル) - チアゾリニウムブロミド; 3 [2- (4'-クロロフェニル) - 2-オキシエチル] - チアゾリニウムブロミド; 3 [2- (4'-クロロフェニル) - 2-オキシエチル] - 4-メチル-5- (2'-ヒドロキシエチル) - チアゾリニウムブロミド; および 3 [2- (4'-メトキシフェニル) - 2-オキシエチル] - 4-メチル-5- (2'-ヒドロキシエチル) - チアゾリニウムブロミドを含む。

【0045】

治療用途、投与経路及び配合

本発明は、虚血損傷を緩和するための新規化合物、医薬配合物及び治療方法を提供する。治療の有効用量は、下記のとおり、適切な医薬担体中に配合してよく、注射(静脈内、腹腔内、筋内、心筋内、皮下)、上皮若しくは皮内の裏打ち(口腔粘膜、直腸及び陸上皮の裏打ち、鼻咽喉粘膜、小腸粘膜)からの吸収、経口、経皮その他の、製薬業界内で利用できるいかなる手段を包含するが、これらに限定されない適切ないかなる手段によって投与してもよい。

【0046】

化合物は、それ自体でか、又は組織虚血を治療若しくは緩和するか、或いは虚血損傷を緩和する用量で、適切な担体又は賦形剤と混合する医薬組成物として、ヒトの患者に投与することができる。好ましくは、治療の本来の部位は、CNS及び心筋である。治療有効用量は、更に、組織虚血を緩和するか、又は虚血損傷

を緩和するのに充分な、化合物の量を意味する。治療有効用量は、単独でか、又は組織虚血のためか、若しくは組織虚血損傷を緩和するためのその他の治療と組合せた、補助治療として投与してよい。本願の化合物の配合及び投与の手法は、[Remington's Pharmaceutical Sciences]、Mack Publishing Co., Easton, PAの最新版に見出し得る。

【0047】

適切な投与経路は、例えば、経口、経直腸、経粘膜又は小腸内投与；筋内、皮下、脳内、脳室内、延髄内注射はもとより、英膜内、直接の心室内、静脈内、腹腔内、鼻内又は眼内注射を包含する非経口送達を包含し、場合により、デボー製剤又は徐放配合物として送達してよい。

【0048】

更に、本発明の薬剤を、標的化薬物送達系として、例えば、組織標的抗体で被覆したリボソームとして投与してよい。リボソームは、標的組織の細胞に照準され、選択的に取り込まれることになる。

【0049】

医薬組成物は、慣用の混合、溶解、糖衣錠製造、浮揚、乳化、カプセル封入、閉じ込め、又は凍結乾燥によって製造してよい。本発明による用途のための医薬組成物は、製剤に用い得る調製物へと活性化化合物を加工するのを容易にする、賦形剤及び佐剤を含む、生理学的に許容され得る1種類若しくはそれ以上の担体を用いて、慣用の方式で配合してよい。適正な配合は、選ばれた投与経路に依存する。

【0050】

注射用には、本発明の薬剤を、水溶液、好ましくは生理学的に融和し得る緩衝液、例えばハंक液、リンゲル液、または生理食塩水緩衝液中に配合してよい。経粘膜投与向けには、浸透させようとする障壁に適切である、透過剤を配合物に用いる。そのような透過剤は、通常、当技術に公知である。

【0051】

経口投与のためには、薬学的に許容され得る担体と活性化化合物とを組合せることによって、該化合物を配合することができる。そのような担体は、治療しよう

とする患者による経口摂取のために、化合物を、錠剤、丸剤、糖衣錠、カプセル剤、液体、ゲル、シロップ剤、スラリー、懸濁液などとして配合するのを可能にする。経口使用のための医薬調製物は、固体の賦形剤とともに、望みであれば、錠剤又は糖衣錠のコアを得るのに適した佐剤を加えた後に、場合により、得られた混合物を摩砕し、顆粒の混合物を加工して得ることができる。適切な賦形剤は、特に、乳糖、ショ糖、マンニトール又はソルビトールを包含する糖類のような充填剤；例えばトウモロコシ澱粉、小麦澱粉、米澱粉、馬鈴薯澱粉、ゼラチン、トラガcantゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース調製物、及び／又はポリビニルピロリドン（PVP）である。望みであれば、崩壊剤、例えば、架橋結合させたポリビニルピロリドン、寒天、又はアルギン酸、若しくはアルギン酸ナトリウムのようなその塩を加えてよい。

【0052】

糖衣錠コアは、適切なコーティングを備える。そのためには、濃縮糖溶液を用いてよく、これは、場合により、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボボルゲル、ポリエチレングリコール、及び／又は二酸化チタン、ラッカー溶液、並びに適切な有機溶媒又は溶媒混合物を含有してよい。特定のためか、又は活性化化合物用量の異なる組合せを特徴付けるために、染料又は顔料を、錠剤又は糖衣錠コーティングに加えてよい。

【0053】

経口的に用いることができる医薬調製物は、ゼラチン製の押込めカプセル剤はもとより、ゼラチン及び可塑剤、例えばグリセリン又はソルビトールで製造した、軟らかい、密封されたカプセル剤を包含する。押込めカプセル剤は、乳糖のような結合剤、澱粉のような結合剤、及び／又はタルク若しくはステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、並びに場合により安定剤との混合物中に、活性成分を含有することができる。軟カプセル中では、活性化化合物を、適切な液体、例えば脂肪性油、液体パラフィン又は液体ポリエチレングリコール中に溶解若しくは懸濁させてよい。加えて、安定剤を加えてよい。経口投与のための配合は、すべて、そのような投与に適する用量としてでなければならない。

【0054】

口腔投与のためには、該組成物は、慣用の方式で配合された、錠剤又はトローチ剤の形態をとり得る。吸入による投与のためには、本発明により用いるための化合物は、エアゾルスプレー供与の形態で、適切な噴射剤、例えばジクロロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素その他の適切な気体を用いて、加圧バック若しくはネブライザーから送達する。加圧されたエアゾルの場合、投与分単位は、計量された量を送達するための弁を与えることによって、計量してよい。吸入器又は吹込装置中に用いるための、ゼラチン製のカプセル又はカートリッジは、該化合物と、乳糖又は澱粉のような適切な粉末基剤との粉末混合物を含ませて配合してよい。

【0055】

該化合物は、注入、例えば巨丸注入又は連続注入による非経口投与に向けて配合してよい。注入用配合物は、単位用量形態で、例えばアンプル又は多用量容器として、防腐剤を加えて供してよい。該組成物は、油状又は水性担体中の懸濁液、溶液若しくはエマルションのような形態をとってよく、懸濁剤、安定剤及び／又は分散剤のような処方剤を含有してよい。

【0056】

非経口投与のための医薬配合物は、例えば、水溶性形態での活性化合物の水溶液を包含する。加えて、活性化合物の懸濁液を、適切な油状注入懸濁液として調製してよい。適切な親油性溶媒又は担体は、ゴマ油のような脂肪性油、又は合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチル若しくはトリグリセリド、又はリポソームを包含する。水性注入懸濁液は、懸濁液の粘性を上昇させる物質、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール又はデキストランを含有してよい。場合により、懸濁液は、適切な安定剤、又は化合物の溶解度を上昇させて、非常に濃縮された溶液の調製を許す薬剤も含有してよい。これに代えて、活性成分は、注入以前に適切な担体、例えば無菌の、発熱源を含まない水を用いて構成するための粉末形態であってもよい。

【0057】

リポソーム及びエマルションは、疎水性薬物のための送達担体の公知の例であ

る。ジメチルホルムアミドのような一定の有機溶媒も、用いてよいが、通常、より強い毒性の苦痛との引き換えとなる。加えて、該化合物は、徐放系、例えば治療用薬剤を含有する、固体疎水性重合体の半透性マトリックスを用いて送達してよい。様々な徐放材料が、当業者によって確立されており、周知されている。徐放性カプセル剤は、その化学的性質に応じて、数週間ないし100日以上にわたって化合物を放出する。治療用薬剤の化学的性質及び生物学的安定性に応じて、安定化のための追加的な方策を用いてよい。

【0058】

該医薬組成物は、適切な固相又はゲル相の担体若しくは賦形剤も含んでよい。そのような担体又は賦形剤の例は、炭酸カルシウム、リン酸化し、様々な糖類、澱粉、セルロース誘導体、ゼラチン、及びポリエチレングリコールのような重合体を包含するが、これらに限定されない。

【0059】

本明細書に記載され、組織虚血を治療若しくは緩和するか、又は虚血損傷を緩和するのに役立つとして特定された化合物の多くは、薬学的に融和し得る対イオンとの塩として与えられ得る。薬学的に融和し得る塩は、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸等々を包含するが、これらに限定されない、多くの酸；又は塩基で形成してよい。塩は、水性その他のプロトン性溶媒に、対応する遊離塩基形態であるより可溶である傾向がある。薬学的に許容され得る塩、担体又は賦形剤の例は、当業者に周知であり、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990に見出すことができる。そのような塩は、ナトリウム、リチウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、酢酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩、マレイン酸塩などを包含するが、これらに限定されない。

【0060】

本発明の用途に適する医薬組成物は、活性成分が、その意図された目的を達成するのに充分な量で含有された、組成物を包含する。より具体的には、治療有効量とは、治療しようとする対象の、現存する症状の発展を防止するか、又はそれ

を緩和するのに有効な量を意味する。有効量の決定は、特に本明細書に与えられた詳細な開示を参照すれば、充分に当業者の能力の範囲内にある。

【0061】

本発明の方法に用いられるいかなる化合物に関しても、治療有効用量は、当初は、細胞培養アッセイから推算することができる。加えて、*in vivo*での実験からの治療上役立つ用量は、本明細書に説明された好適実施態様の*in vivo*データにより与えられる。そのような情報を用いて、ヒトにおける役立つ用量をより正確に決定することができる。

【0062】

治療有効用量とは、患者の延命において、発作又は損傷の、さもなければ予測される重篤度の緩和を招く化合物の量を意味する。そのような化合物の毒性又は治療薬効は、LD₅₀（集団の50%に致死的な用量）及びED₅₀（集団の50%に治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養又は実験動物での標準的な製薬学、薬理学及び毒物学的手順によって決定することができる。毒性効果と治療効果との用量比が、治療指数であり、LD₅₀とED₅₀との比として表わすことができる。高い治療指数を示す化合物が好ましい。細胞培養アッセイ又は動物研究から得られたデータは、ヒトに用いるためのある範囲の用量を配合するのに用いることができる。そのような化合物の用量は、好ましくは、毒性が僅少又は皆無であるED₅₀を包含する循環濃度の範囲内にある。用量は、この範囲内で、用いる用量形態、及び利用する投与経路に応じて変動してよい。

【0063】

投与分の量及び間隔は、望みの調節効果を維持するのに十分な、活性部分の血漿レベル、又は最低有効濃度（MEC）を与えるよう、個別に調整してよい。MECは、化合物ごとに変動することになるが、*in vitro*データ；例えば、ポリアミン誘導若しくは3-アミノプロパナール仲介細胞損傷（*in vitro*）の50～90%の阻害を達成するか、又は*in vivo*での発作又は虚血性損傷の、さもなければ予測される重篤度の軽減を、本明細書に記載のアッセイを用いて達成するのに必要な濃度から推算することができる。MECを達成するのに必要な用量は、個々の特性、及び投与経路に依存することになる。しかし、IPLCアッセイ、パ

イオアッセイ又は免疫アッセイを用いて、血漿濃度を決定することができる。

【0064】

投与される組成物の量は、治療しようとする患者、患者の体重、病気の重篤度、投与の方式、及び処方医の判断に依存することになる。

【0065】

スクリーニングアッセイ

本発明は、更に、ポリアミン化合物又は3-アミノプロパナルを試験動物の脳実質内に微量注入によって投与し、試験化合物又は対照薬剤を局所的又は全身的に投与し、そして該試験動物からの染色された脳切片における、微量注入の局在によって発生した皮質細胞毒性を測定することを含む、*in vivo*スクリーニングアッセイを提供する。好ましくは、試験動物は、ラットである。好ましくは、染色された脳切片の細胞毒性は、面積測定分析によって測定する。下記の実施例2は、この*in vivo*アッセイの手順を用いた実験を提示し、3-アミノプロパナル、スベルミン及びスベルミジンの、しかしブトレッシンにはない細胞毒性を立証する。ポリアミンオキシダーゼ阻害剤であるクロロキン及びアミノグアニジンの全身的投与によって、モデルを確認した。

【0066】

本発明は、更に、培養された膠細胞又はニューロン細胞の類縁細胞系を、約50～約1,000 μ Mの濃度の3-アミノプロパナルに接触させ、様々な濃度の試験化合物又は対照培地を細胞培養体に加え、約5分～約20分の期間、細胞培養条件下で温置し、細胞生存率の百分率を決定することを含む、*in vitro*スクリーニングアッセイを提供する。好ましくは、細胞培養培地中の3-アミノプロパナルの濃度は、約80 μ Mである。好ましくは、細胞生存率を決定する方法は、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム(MTT)の代謝的に依存性の減少を測定することによる。細胞死を決定するもう一つの方法は、例えば、末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを介するdUTPニック末端標識化(TUNEL)法[Gavrieli et al., J. Cell Biol. 119:493-501, 1992]によって、アポトーシスの証拠を探すことによる。下記の実施例3は、*in vitro*スクリーニングアッセイに関する追加的作業を

提示し、下記の実施例5は、様々な試験化合物による例示的アッセイの結果を示す。

[0067]

実施例1：3-アミノプロパナールは、虚血に由来する組織損傷を媒介するポリアミノオキシダーゼ活性は、虚血に続いて増加する。

ポリアミノオキシダーゼ活性、およびポリアミンから発生される代謝産物の、虚血に伴う組織損傷における役割を測定するために、卒中発作の動物モデルを実施した。ルイスラットを、以前に記載 (Zimmermann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA92:3744-3748, 1995; Cockroft et al., Stroke 27:1393-1398, 1996; and Meistrell III et al., SHOCK 8:341-348, 1997) された標準化モデルで中大脳動脈の顕微外科的閉塞により病巣脳虚血に付した。簡潔に、同側総頸動脈を結紮し、分割し、中大脳動脈を凝固し、末端をレンズ核線条体分枝に分割し、対側総頸動脈を一時的に1時間塞閉した。これらの実験における虚血の開始は、中大脳動脈の切断時間として定義した。梗塞容積の測定のため、動物を示された時間で安楽死させ、新鮮な脳の切片(1mm)を準備し、154mMのNaCl中の2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド(TTC)に37℃で30分間浸け、総脳梗塞容積を、他に記載 (Zimmermann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA92:3744-3748, 1995; Cockroft et al., Stroke 27:1393-1398, 1996; and Bederson et al., Experientia 41:1209-1211, 1986) されたようにコンピュータ化定量面積測定により測定した。発作容積(梗塞容積)の同様な測定を、ヘマトキシリンおよびエオジンにより染色された脳の切片の面積測定分析を使用した別個の実験により得た。本実施例および続く実施例における動物に関わる手順の全ては、Animal Care and Use Committee of North Shore University Hospital-New York University Medical Schoolの指針に従い、許可の下に実施された。

[0068]

組織ポリアミノオキシダーゼ活性を測定するために、中大脳動脈により灌流された解剖領域から脳ホモジネートを調製し、以前に記載された方法 (Seiler and BoTKenius, Neurochem. Res. 10:529-544, 1985; Seiler et al., Med. Biol.

59:334-346, 1981; and Milani et al., J. Neurosci. Res. 28:434-441, 199

1) を使用して、添加のスベルミンの代謝転換に依存して、総ポリアミンオキシダーゼ活性を測定した。簡単に、中大脳動脈の永久塞閉の2時間後、虚血領域を包含する同側半球の4 mm厚の冠状切片（前頭葉極から尾側へ3 mm）を、フェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）1 mMを含有するHanks培地1.5 ml中の氷上で手動により均質化し、43,000×gで30分間遠心分離した。得られたホモジネートの上澄みにおける脳ポリアミンオキシダーゼ活性を、時間0でのスベルミンの添加により測定した（ホモジネート上澄み1 ml当たり1 mM原液50 μ lを添加）。酵素阻害剤を使用する試験として、薬理学的濃度範囲（5 μ M～5 mM）のアミノグアニジンまたはクロロキンをスベルミンの5分前に添加した。スベルミン含有上澄は、37℃に維持し、スベルミン添加後60分までの時点で、試料200 μ lを二重に除去し、60%過塩素酸（PCA）10 μ lの添加により、酵素活性を停止した。スベルミンを測定するHPLC分析用の試料を、ダンシルクロリドにより調製（アセトン中の10 mg/mlダンシルクロリド溶液200 μ lおよび試料ホモジネート上澄み50 μ l当たり飽和水性Na₂CO₃ 200 μ l；65℃で10分間インキュベート；短時間遠心分離して透明にする）して、ダンシル化スベルミンを、HPLC（20 μ l注入物質；Vydac分析C4カラムで直線勾配0～100%メタノール（H₂O中）により溶離）により精留した後、蛍光により測定した。酵素活性を、ホモジネート上澄みのタンパク質含有量のために修正し、データは、平均±標準偏差；条件当たりn=3のホモジネートで表した。

[0069]

ポリアミンオキシダーゼ活性は、対側性（対照）の脳半球と比べて、虚血大脳半球から調製されたホモジネートにおいて有意に高かった（虚血後のPAO活性=15.8±0.9/h/mgタンパク質vs.対側性の対照中のPAO活性=7.4±0.5 nmol/h/mgタンパク質、P<0.05；図1を参照のこと）。この脳ポリアミンオキシダーゼ活性の増大は、脳虚血の発症の2時間後という早期に検知され、虚血に対する最も迅速な応答の部分として、増大したPAO活性が起ったことを暗示している。

【0070】

構造的に別個の2種のポリアミノキシダーゼ活性阻害薬アミノグアニジン及びクロロキン (Seiler et al., Med. Biol. 59:334-346, 1981; Holttta, Biochem. m. 16:91-100, 1977; Flayeh, Clin. Chem. 34:401-403, 1988;及びGhal and Pitot, Biochem. J. 202:603-611, 1982) を選択して、このスベルミン代謝活性の特異性を決定した。虚血脳のホモジネートへのこれらの薬剤のいずれかの添加が、ポリアミノキシダーゼ活性を用量依存的に阻害した (図1を参照)。クロロキン $IC_{50} = 40 \mu M$ 、アミノグアニジン $IC_{50} = 400 \mu M$ 。これらのデータは、脳虚血の発生後2時間以内に、脳ポリアミノキシダーゼ活性の特異的誘導が起こり、この活性がポリアミノキシダーゼの公知の阻害薬による阻害を受けやすいことを示す。

【0071】

3-アミノプロパナール濃度は虚血後に増大する。

病巣脳虚血に伴う脳PAO活性の増大が3-アミノプロパナール生成の増大を引き起こすかどうかを判定するため、組織試料中の3-アミノプロパナールを検出するための方法を開発した。この方法を開発するため、3-アミノプロパナールを、ジエチルアセタールの加水分解によって調製したのち、2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンを使用して誘導体化した。具体的には、3-アミノプロパナールは、 $145 mM$ 3-アミノプロパナールジエチルアセタール (TCI America) を $1.5 M$ HCl 中、室温で5時間加水分解することによって調製した。反応混合物をDowex-50 (H+型) イオン交換樹脂のカラム ($3 cm \times 6 cm$) に適用し、 $0 \sim 3 M$ HCl のステップ勾配 ($160 ml$; 流量 $0.7 ml/min$) で溶離させた。Bachrach及びRechtesの方法 (Bachrach and Rechtes, Anal. Biochem. 17:38-48, 1966) による測定でアルデヒドを含有する画分を遠心エバポレータに移して室温で濃縮した。アルデヒド (すなわち3-アミノプロパナール) の濃度を、アルデヒドと4-アミノ-3-ヒドラジノ-5-メルカプト-1, 2, 4-トリアゾール ('Purpald'; Aldrich) との反応に基づき (Dickinson and Jacobson, Chemical Communications 1719-720, 1970)、プロピオンアルデヒド (Sigma) を使用する標準曲線を参照して、分光光度計測によって $531 nm$ で測定した。ア

ルデヒドの酸性溶液を使用直前にNaOHで生理学的pHまで中和した。同じ化学量論的量のHCl及びNaOHからなるビヒクル対照溶液を調製した。

【0072】

3-アミノプロパナールを誘導体化するため、2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン (2, 4-DNPH; 濃縮HCl/エタノール (1:10容積) 11ml中に溶解した2, 4-DNPH 0.5g) を水性3-アミノプロパナールとともに10秒間灌流させた。得られた3-アミノプロピオンアルデヒド-2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体 (3-AP-2, 4-DNPH) を室温で沈殿させ、ろ過によって収集した。精製した2, 4-ジニトロフェニルヒドラゾン誘導体の¹H-NMR分光法 (DMSO-d₆及びCDCl₃, 270MHz) を使用してその構造を確認した。NMRスペクトルは、 δ 8.83及び δ 11.35の共鳴でsyn及びanti異性体 (1:1) の存在を明らかにした。化合物のダンシル化誘導体のHPLC検定によって標準曲線を構成した (以下参照)。

【0073】

組織ホモジネートからの誘導体化3-アミノプロパナールの回収を定量するため、さらなる標準曲線を構成した。中大脳動脈によって灌流した領域から得た厚さ4mmの脳スライスを手早く手作業で均質化したのち、3-アミノプロパナール (100、150、200、300、1000nmol/ml) 及び2, 4-DNPH試薬 1.5mlを加えた。2, 4-DNPH試薬の存在で試料を10秒間灌流させたのち、60%過塩素酸 (PCA) 20 μ lを加えて反応を停止させ、続いて水 200 μ lを加えた。試料を激しくかき回し、14,000rpmで30分間遠心分離させ、上澄み液を遠心エポレータ中で乾燥状態近くまで濃縮した。サンプルを水100 μ lに再び溶解させ、14,000rpmで10分間遠心分離させて沈殿物を除き、HPLCによる検定に備えた。

【0074】

3-アミノプロパナール及び2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンの誘導体化生成物の検出のために、以下のようにHPLC検出系を使用した。オートサンブラ、フォトダイオードアレイ及び蛍光検出器ならびにChemstationオペレーティングソフトウェアを備えたHewlett-Packardモデル1090液クロマトグラフ (Wilmi

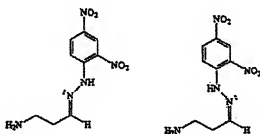
ngton, DE, USA) をすべての分析に使用した。蛍光による検出は、5-ジメチルアミノナフタレンスルホニルクロリド (塩化ダンシル; モレキュラープローブ; 340 nmの相対蛍光、430 nmで励起) と第一級及び第二級アミンとの反応に基づいて使用した。試料 $50 \mu\text{l}$ を、アセトン中 10 mg/ml の塩化ダンシル溶液 $200 \mu\text{l}$ 、 Na_2CO_3 飽和溶液 $200 \mu\text{l}$ 、60% PCA $3 \mu\text{l}$ 及び 1 mM 、7-ジアミノヘプタン (Sigma) $3 \mu\text{l}$ と反応させ、続いて 65°C で10分間インキュベートすることにより、ダンシル化を実施した。得られた誘導体化試料 $20 \mu\text{l}$ を、5 nmの粒径のVydac C-4 $250 \times 4.6 \text{ mm}$ カラムに注入した。1.0 ml/minの流量を使用して、A ($\text{d H}_2\text{O}$) 100%で処理を開始し、45分かけてB (メタノール) 100%までの直線勾配を実施したのち、B 100%を5分間続け、5分かけてA 100%に戻した。

【0075】

2, 4-DNP-H-誘導化された、ダンシル化された生成物のHPLC分析は、下記式:

【0076】

【化9】



【0077】

に示される幾何異性体 (ダンシル化されていない) に帰属する、同じ比率の二つのピーク (24 min及び27 min) を示した。

【0078】

HPLC-精製された生成物のエレクトロクロスプレーイオン化マスペクトル (EIMS) は、非-ダンシル化異性体のための予期したマスイオン m/z 251に一致した。

【0079】

脳ホモジネートは、永久病巣脳虚血に付したラットから、虚血の2時間又は25時間後に上記のように調製し、ホモジネートを、2, 4-ジニトロフェニルヒドラジンで上記のように誘導体化した。ダンシル化し、誘導体化されたホモジネートのHPLC分析は、二つのピークの出現を示し、EIMSは、異性体の3-アミノプロパナール-2, 4-ジニトロフェニルヒドラジン反応生成物として、それらを同定した。3-アミノプロパナール誘導体化生成物は、偽（シャム）-操作の、正常灌流の対照動物から調製された脳ホモジネート中でこのHPLCに基づくアッセイにより検出されず、虚血が3-アミノプロパナールの出現を仲介することを示す、

【0080】

したがって、誘導体化3-AP（上に記載されている）のための定量的なHPLCに基づくアッセイ（それは、再現的に、脳組織中に $1 \sim 2 \mu\text{M}$ の3-アミノプロパナールを検出する）の使用は、3-アミノプロパナールは、正常に灌流された脳から調製されたホモジネート中に存在しないか又は産生されないことを示した。しかしながら、脳虚血の開始から2時間以内に、顕著に増大した3-アミノプロパナール濃度が存在することが観察され、それは、虚血の開始から少なくとも25時間の間、時間依存の様式で、更に増大した（図2参照：結果は、1, 7-ジアミノヘプタンの内部標準を用いて、HPLC注入量の訂正した後、ブラッドフォード方法（Biorad）により測定され、タンパク質含量の正常化の後に表現されている。データは、平均±標準偏差；群当たり $n = 3 \sim 4$ 動物）。脳虚血は、脳ポリアミンオキシダーゼ活性の初期誘導を仲介するとの以前の観察を考慮すると、これらの発見は、虚血が、代謝物として3-APをもたらすPAO活性を誘導することを示し、この酵素経路は、脳虚血の開始後、少なくとも初めの日の間3-アミノプロパナールを生成し続けることを示している。

【0081】

3-アミノプロパナールは、タンパク質のアミノ及びスルフヒドリル基に結合することができる反応性分子である（Brunton et al., Toxic. In Vitro 8:337-341, 1994;及びSeiler, Digestion 46:319-330, 1990）ので、実施されたHPL

Cアッセイは、虚血脳中に生成した3-アミノプロパナールの量を過小評価しており、それにより誘導体化及び検出のためのその利用性が減少している。それにもかかわらず、全脳タンパク質(213 g/kg)のための測定された濃度を補正した後、虚血後脳の3-アミノプロパナール濃度は、高い細胞傷害性の範囲(0.75~2.0 mM)に達する。

【0082】

実験の別の組は、脳細胞死の発生に対する、3-アミノプロパナール産生の時間経過を試験するために実施された。これらの実験は、3-アミノプロパナールの酵素による形成が脳細胞死の開始の一時的な逆流であるかどうかを試験するために必要である。したがって、細胞死の容積は、虚血脳から切片を調製し、重要な染料、2, 3, 5-トリフェニルテトラゾリウムクロリド(TTC)で染色し、多くの切片を越えて死組織の全領域を積分することにより、測定される。虚血の最初の3時間の間、閉塞された中大脳動脈の領域の細胞は、大部分生存しているのが観察されている(細胞死の全容積 = $2 \pm 2 \text{ mm}^3$)。ヘマトキシリン及びエオシン-染色の脳切片の組織学的実験により、細胞は、形態学的には、損傷を受けておらず、3-アミノプロパナール濃度が、既に有意に増大しているそのとき、退行的な変化にまだ達していないことが確認された。次ぎの25時間に、脳細胞死の容積が、有意に大きな領域を含むように「広がる」ことが観察された(25時での梗塞容積 = $71 \pm 24 \text{ mm}^3$; 対3時間での梗塞容積 = $2 \pm 2 \text{ mm}^3$; $p < 0.05$)、そしてこの「広がる」細胞死は、上昇する3-アミノプロパナール濃度に関連して発展している。これらの発見は、3-アミノプロパナールの有意な蓄積が、脳虚血に対する初期の応答時で起こり、明白な、連続的な脳細胞死の発生に先行するとの証拠を与えている。

【0083】

例2: 3-アミノプロパナール媒介組織損傷を阻止する薬剤のインビトロスクリーニング検定

外因性3-アミノプロパナール又は代謝されると3-アミノプロパナールを生成することができるポリアミンがインビボで脳損傷を引き起こす。

ポリアミンオキシダーゼ活性は正常な哺乳動物脳中に存在するため(Paschen,

Cerebrovasc. Brain Metab. Rev. 4:59-88, 1992及びSeiler and Bolkenius, Neurochem. Res. 10:529-544, 1985)、次の実験によって、細胞外濃度の基質（たとえばスベルミン又はスベルミジン）の増加が3-アミノプロパナールの生成を刺激し、局所的な細胞死を誘発するかどうかを調査した。この可能性を調査するため、スベルミン、スベルミジン及びそれらの代謝産物を直接定位微量注射によってラットの大脳皮質に投与し、脳切片をTTC染色することにより、生じた細胞死の脳体積を計測した。ポリアミン又は3-アミノプロパナールを、中大脳動脈によって灌流される定位/解剖学的座標に一致する選択部位への定位誘導微量注射により、インビボでラット大脳皮質に投与した。すばやく、雄ルイスラット（230～300g）を麻酔処理し、定位頭部枠（Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA）に配置した。ラムダ及び前頂によって画定される平面がベースプレートに並行になるまで切開バーを調節した。前頂の前方1.7mmかつ中心線の右5mmで顕微鏡的開頭術を実施し、29ゲージ針の先端を、硬膜に達する深さ2mmまで進入させた。無菌塩水（NaCl, 154mM）中で調製したポリアミン含有溶液（25µg/2µl）を3分かけて注射し、針を動かさずに5分間静置したのち抜き取った。48時間後、実験動物を安楽死させ、脳を切除し、冠状平面で厚さ1mmにスライスし、切片を、2, 3, 5-トリフェニル-2H-テトラゾリウムクロリド（NaCl中2%、154mM）を含有する溶液（NaCl中2%、154mM）中、37℃で30分間浸漬した。赤く染色された生存組織に対して容易に対比する非染色（白）区域として脳梗塞を視覚化した。スライスを緩衝10%ホルマリンに漬け、面積計測分析によって梗塞サイズを定量的に評価した。別個の実験では、脳切片の組織病理学的分析によって注射部位を確認し、TTC染色によって組織損傷の相関関係を明らかにした。前記実験条件それぞれに3～4匹のグループを使用した。

【0084】

スベルミン又はスベルミジンは大脳皮質内投与された実験動物には脳組織損傷があったが、ポリアミンオキシダーゼによって分解されず3-アミノプロパナールを生成することのないポリアミンであるブトレッシン大脳皮質内投与した後で、細胞死は見られなかった（図3を参照）。投与した3-アミノプロパナール

の量（1回の注射で $25\mu\text{g}$ ）は、虚血中に内因的に生成された量（典型的な中大脳動脈閉塞の分布の量を仮定して約 $350\mu\text{M}$ ）に類似していた。これらの量の3-アミノプロパナールの大脳皮質内投与は、有意な細胞傷害性を大脳皮質に生じさせた。ポリアミノオキシダーゼ阻害剤クロロキン及びアミノグアニジンの全身投与は、スベルミン媒介大脳皮質内損傷の発生に対する有意な保護を与え（図4を参照）、細胞外スベルミンの細胞傷害性を媒介するためにはポリアミノオキシダーゼ活性が必要であることを示唆した。アミノグアニジンの大脳皮質内投与はまた、スベルミン媒体細胞死に対する有意な保護を与え（図4を参照）、酵素阻害剤の大脳保護効果が脳皮質中で局所的に起こり、予期しない周辺薬物作用を介して起こるものではないことを示した。注目すべきことに、アミノグアニジンは、大脳皮質内3-アミノプロパナールの直接細胞傷害性を有意に弱毒化することはできず（図4を参照）、スベルミン細胞傷害性に対するアミノグアニジンの保護機構がポリアミノオキシダーゼの阻害を介するものであり、3-アミノプロパナールの細胞傷害性を直接阻止することによるものではないことを示した。

【0085】

したがって、スベルミン、スベルミジン又は3-アミノプロパナール（ただし、ブトレッシンではない）の細胞外濃度の増大は、インビボで、この場合には大脳皮質細胞に対して細胞傷害性である。さらには、このモデルは、3-アミノプロパナール媒介組織損傷を阻止する試験化合物及び組成物の活性に関する簡便な検定を提供する。試験化合物又は組成物は、多様な投与形式（静脈内、腹腔内、経口、筋肉内、頭蓋内）のいずれでも、3-アミノプロパナールを組織、たとえば脳に実験的に導入する前又は導入した後の種々の期間のいずれで投与してもよい。そして、投与された3-アミノプロパナールのインビボ細胞傷害性効果を拮抗する試験化合物及び組成物の活性を、たとえば、誘発された細胞死又は組織梗塞の程度を評価するための生体染色によって簡便に評価することができる。

【0086】

3-アミノプロパナールは細胞壊死及びアポトーシスをインビボで媒介する。

虚血中の組織損傷の元にある内因性機構を解明するため、一連の実験を実施し

た。具体的には、ポリアミン又は3-アミノプロパナールを大脳皮質内投与された実験動物の脳細胞の運命を研究した。3-アミノプロパナールの大脳皮質内微量注射が変性を注射区域の周囲の組織に局限化した24時間後に採取した脳組織に対し、組織病理学的試験を実施した。3-AP又は種々のポリアミンの定位誘導微量注射を大脳皮質内に実施した。実験動物を麻酔処理したのち、塩水(30 ml、pH=7.4)、ホルムアルデヒド(100 ml、PBS中4%、pH=6.5)、そしてホルムアルデヒド(100 ml、4%、pH=8.5)を順に経心臓的に灌流させることによって、組織検査用の組織を調製した。組織を30分間、後固定したのち、スクロース(50 ml、0.1M PBS中20%、pH=7.4)を灌流させた。次に、脳を取り出し、スクロース中4℃で一夜保存し、厚さ1.0 mmの切片に切斷した。キットを使用して、製造業者の指示(ApopTag, Oncor)にしたがって、デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)媒介dUTP-ビオチン切れ目(hick)末端標識(TUNEL)染色を実施した。エオシン陽性染色によって証明されたように、3-アミノプロパナール注射部位に近い細胞は壊死を起こしていた。そのうえ、同じ領域においては、TUNEL陽性染色によって証明されたように、細胞は、プログラム細胞死を起こしつつあった。ビヒクル又はブトレッシンを投与した場合、注射区域でこれらの変化は見られなかった。スベルミンの直接大脳皮質内投与はまた、細胞壊死及びアポトーシスを生じさせ、この変性は、アミノグアニジンの投与によって有意に阻止された。したがって、細胞外3-アミノプロパナールの大脳皮質内投与に応答するインビボでの脳組織損傷の蓄積は、細胞壊死及びプログラム細胞死の両方を介して起こる。

[0087]

例3：虚血後の組織損傷及び細胞死を阻止又は最小限にするための薬剤のインビトロスクリーニング検定

3-アミノプロパナールは、グリア細胞中ではアポトーシスを誘発するが、ニューロン細胞中では細胞壊死を誘発する。

3-アミノプロパナールによって誘発される細胞傷害性機構及び対応するシグナリングカスケードを直接的に調査するため、培養ヒトグリア(HTB14)及びニューロン(HTB11)細胞株を3-アミノプロパナールに暴露した。グリ

ア細胞株 (HTB14) (Ponten and Macintyre, Acta Pathol. Microbiol. Scand. 74:465-486, 1968) 及びニューロン細胞株 (HTB11) (Bluestein, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3965-3969, 1978) は、ATCC (American Type Culture Collection) から取得し、空气中5%CO₂の加湿雰囲気中37℃で、10%ウシ胎児血清 (FBS, Hyclone)、1mM Na ビルベート (Sigma)、0.5%ペニシリン/ストレプトマイシン (Sigma) で補足した最小イーグル培地 (MEM, Gibco) で培養した。3-アミノプロパナールに対する暴露を含むすべての実験について、細胞は、96ウェルのマイクロタイタプレートで集密度90~95%まで増殖させた。すべての実験に先立ち、3-アミノプロパナールと血清タンパク質との相互作用を最小限にするため、培地を新たな無血清培地 (Opti-MEM I) で置き換えた。短期間の3-アミノプロパナール暴露 (96ウェルプレート中で5分~2時間) を使用するすべての実験について、細胞を指示された時間に洗浄し、細胞生死判別評価の前にOpti-MEM I 中で20時間までインキュベートした。3-AP暴露後の細胞死におけるカスパーゼ-1及びカスパーゼ-2の関与の評価は、細胞をカスパーゼ-1阻害剤Ac-YVAD-CMK (BACH EM) 又はカスパーゼ-3阻害剤Ac-DEVD-CHO (Peptides International) で3時間前処理したのち、さらに5時間、3-アミノプロパナールを添加することによるものであった。DMSO対照を実施して溶媒の影響を評価した。3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド (MTT) (Sigma) の代謝依存性還元によって細胞生存率を計測した (Siewerts et al., Eur. J Clin. Chem. Clin. Biochem. 33:813-823, 1995)。データを平均±標準偏差として表し (条件あたりn=3~6ウェル)、実験を3回一組で実施した。

[0088]

20時間のインキュベーションののち、3-アミノプロパナールの細胞傷害性LD₅₀を、グリア細胞株HTB-14の場合で275±10μM、ニューロン細胞株HTB11の場合で90±20μMと推定した。3-アミノプロパナールは、ラット大グリア細胞一次培養物中で比較的細胞傷害性であった (LD₅₀=80±9μM)。時系列研究は、わずか5分間の3-アミノプロパナール暴露がニュー

ーロン細胞に対して有意に細胞傷害性であるが、グリア細胞中で有意な細胞傷害性を媒介するためにはより長期の暴露が必要であることを明らかにした（以下の表Iを参照）。

【0089】

表I. 3-アミノプロパナールに曝露後の細胞生存率の時間経過的検討

グリア又はニューロン細胞系培養物を、 LD_{50} 濃度の3-アミノプロパナール（それぞれ750又は350 μ M）に、示した時間曝露し、次に培地を血清を含まないもの（3-A-Pなし）に代えて、総インキュベーション時間を20時間とした。次にMTTアッセーにより細胞生存率を測定した（示したデータは、平均±標準誤差である）。細胞生存率は、ビヒクル処理対照における全時間に対し100±4%であった。

【0090】

【表2】

細胞生存率 (% 生存)

時間(min)	グリア細胞(mm^2)	ニューロン細胞 (HTB 11)
5	96±3	29±6
60	92±1	13±4
120	78±7	6±2
1200	5±5	3±1

【0091】

この潜在的な発生は、グリア細胞死がアポトーシス媒介経路に依存するかもしれないことを示唆する。この可能性と一致して、アポトーシス特異性DNA断片パターンは、HTB-14グリア細胞を3-アミノプロパナールに暴露したのち見られたが、培養ニューロン細胞HTB-11の対応する暴露の後は見られなかった。

【0092】

末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介dUTP切れ目末端標識(TUNEL)法 (Gavrieli et al., J. Cell. Biol. 119:493-501, 1992) を使用して、DNAストランド断断のフローサイトメトリー検出によるアポトーシスのさ

らなる実証を得た。末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ媒介dUTP切れ目末端標識 (TUNEL) 染色は、3-アミノプロパナールで前記のように処理した細胞培養物に対して実施した。1500rpmで5分間の遠心分離によって細胞を採取し、収集した。ペレットを、室温で40分間、1X ORTHO Permeaffix (Orthodiagnostics) で固定した。1%ウシ血清アルブミンを含有するダルベッコリン酸緩衝溶液 (PBS-BSA) で洗浄したのち、TUNEL法により、Oncor ApopTag直接フルオレセインキット (Oncor) を使用し、製造業者の指示にしたがって細胞を染色した。TdTを欠く反応溶液を調製することによって陰性対照を実施した。Becton Dickinsonフローサイトメータをすべての分析に使用した。単一色手順にしたがって5000~10000のイベント (ゲートコントロールなし) を収集した。

[0093]

これらの実験では、275 μ M3-アミノプロパナールに13時間暴露されたのち、グリア細胞の76%がTUNEL陽性に染色されたが、ビヒクル処理された対照細胞は一樣にTUNEL陰性であった。マルチパラメータフローサイトメトリーは、3-アミノプロパナールに暴露されたグリア細胞集団が、典型的な細胞収縮、クロマチン凝縮及びアポトーシスの核フラグメント化と合致する細胞前方散乱の減少及び側方散乱の増大を示すことを明らかにした。グリア細胞のアポトーシスはまた、ヨウ化プロビジウム及びアネキシンV/PIを使用する副2重 (subdiploid) 染色によって確認した。

[0094]

グリア細胞株 (HTB-14) における結果とは対照的に、類似した実験法を使用しても、3-アミノプロパナールはニューロン細胞培養物 (HTB11) 中にアポトーシスを誘発しなかった。HTB11又はHTB14細胞からのDNAサンプル (20~30 \times 10⁶個) を、採取した細胞 (3-AP又は対照で処理) を、プロテイナーゼKを含有する反応緩衝剤中に再び懸濁させ、55℃で一夜インキュベートすることにより、ストランド破断に関して検定した。RNaseを50mg/mlの最終濃度まで加え、サンプルを37℃で1時間インキュベートした。DNAをフェノール/クロロホルムで3回抽出し、クロロホルムで2回抽出

し、冷却した100%エタノール及び0.3M酢酸ナトリウム(pH5.2)2倍量中に沈澱させた。DNAを dH_2O 50 μ l中に再び懸濁させ、1.5%アガロースゲル電気泳動によって分画し、SYBRグリーンI核酸染色(Molecular Probes)で染色した。

【0095】

3-アミノプロパナル処理したニューロンから調製したDNAの電気泳動は、染色体DNA分解の証拠を示さなかった。加えて、これらの条件の下でTUNEL陽性の増大は見られなかったが、前方散乱/側方散乱分析は、3-アミノプロパナル処理後の有意な細胞死(55.7%)を明らかにしたが、ビヒクル処理した対象では明らかにしなかった(9.1%)。

【0096】

アポトーシスと関連する細胞膜リン脂質非対称性の損失を検出するために使用される方法である、アネキシンVを用いる計測でアポトーシスの証拠はなかった。アネキシンV/ヨウ化プロビジウム(PI)染色は、キットを使用して、製造業者の指示(アポトーシス検出キット、R&D Systems, Minneapolis)にしたがって実施した。染色が完了してから1時間以内にフローサイトメトリーによって細胞を分析した。アネキシンV-FITC及びPIシグナルを、二色フローサイトメトリー法にしたがって個々に量化した。

【0097】

TUNEL及びアネキシンV法によって評価されるように、カンプトテシンへの暴露(Furuya et al., Anticancer Res 17:2089-2093, 1997)(15 μ g/mlで20時間)により、ニューロン細胞中にアポトーシスを誘発し、3-アミノプロパナル暴露後のアポトーシスの不在がこれらのニューロン様細胞における予期しない汎化細胞欠陥によるものではないことを示した。したがって、グリア細胞とは対照的に、3-アミノプロパナルへのニューロン細胞の暴露が主に細胞壊死を引き起こす。

【0098】

この例に記載するインビトロ細胞培養実験は、3-アミノプロパナル媒介細胞傷害性を阻止し、インビボで組織損傷を緩和する同様な利点を予想させる試験

化合物及び組成物の活性の簡便な検定を提供する。試験化合物又は組成物は、3-アミノプロパナールを、グリア様（たとえばHTB-14）、ニューロン様（たとえばHTB-11）又はインビボで虚血損傷を受ける他の細胞もしくは組織に典型的である細胞培養物に実験的に導入すると同時に、その前に、又は導入後の種々の時点で導入することができる。そして、投与された3-アミノプロパナールのインビトロ細胞傷害性効果を拮抗する試験化合物及び組成物の活性をたとえば染色によって簡便に評価して、誘発された細胞死の程度を評価し、さらに前記細胞傷害性を細胞壊死対アポトーシスとして特徴づけることができる。

【0099】

カスパーゼ-1はグリア細胞培養物の3-アミノプロパナール誘発アポトーシスにおいて役割を演じる。

システインプロテアーゼICE（インターロイキン-1 β 転換酵素、カスパーゼ-1）及びシステインプロテアーゼP-32（CPP-32、カスパーゼ-3）は、大脳虚血中にアポトーシスを媒介する細胞シグナリング経路中で暗示されている（Bhat et al., J. Neurosci. 16:4146-4154, 1996; Loddick et al., Neuroreport. 7:1465-1468, 1996; Hara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:2007-2012, 1997及びFriedlander et al., J. Exp. Med. 185:933-940, 1997）。

3-アミノプロパナールによるグリア細胞へのアポトーシスの導入のためにこれらのプロテアーゼが必要であるかどうかを調査するため、HTB 14細胞を、テトラペプチドICE阻害剤（Ac-YVAD-CMK）又はCPP-32阻害剤（Ac-DEVD-CHO）で3時間処理したのち、3-アミノプロパナールで5時間処理した。CPP-32阻害剤ではなくICE阻害剤による処理は、3-アミノプロパナール誘発細胞死の用量依存性阻止を与え（図5を参照）、3-アミノプロパナール誘発アポトーシスにはICEプロテアーゼが必要であることを示した。これらのデータは、グリア細胞中でアポトーシスを媒介する3-アミノプロパナール誘発シグナリングにおけるICEの特異的な役割の証拠を与え、3-アミノプロパナール誘発組織損傷を緩和する活性を有する化合物及び組成物を同定するためのインビトロスクリーニング検定でのこれらの利用性をさらに実証する。

【0100】

例4：虚血後の組織損傷を緩和する活性を有する化合物及び組成物のインビボスクリーニング検定

ポリアミノキシダーゼ阻害剤の投与がインビボで3-アミノプロパナール生成を減衰し、虚血誘発組織損傷に対して保護する。

本明細書で記載する虚血誘発細胞死及び組織損傷の機構は、大脳虚血中のポリアミノキシダーゼ阻害剤の投与がインビボで3-アミノプロパナールの蓄積及び大脳梗塞の体積の両方を減らすことを予測する。したがって、前記永久的な中大脳動脈閉鎖の標準化モデルで構造的に別個の2種のポリアミノキシダーゼ阻害剤をラットに投与したのち、これらの終点を計測した。大脳虚血の発生ののち投与したアミノグアニジン（虚血後15分に320mg/kg腹腔内、その後8時間ごとに110mg/kg腹腔内）が、大脳損傷の体積を有意に減らした（Cockcroft et al., Stroke 27:1393-1398, 1996）。この確立された治療プロトコルによって投与されたアミノグアニジンは、脳中3-アミノプロパナール濃度の上昇を効果的に防止した（表IIを参照）。ラットを永久的中大脳動脈閉鎖に付し（n=4/グループ）、虚血の発生後25時間で前記のように梗塞体積を計測した。処理した実験動物には、虚血後15分で、アミノグアニジン（AG；虚血後15分に320mg/kg腹腔内、その後8時間ごとに110mg/kg腹腔内）、クロロキン（CQ；虚血後15分に25mg/kg腹腔内）又はビヒクル（塩水、腹腔内）を投与した。表IIは、ポリアミノキシダーゼの構造的に異なる2種の阻害剤（AG及びCG）が大脳梗塞を減衰し、AGが虚血に伴う3-アミノプロパナールの局所的増加を防止しうを示す。

【0101】

【表3】

表 11

	梗塞容積 (mm ³)	脳内3-アミノプロパナール濃度 (μ mol/g タンパク質)
ビヒクル	71 \pm 24	13 \pm 8
アミノグアニジン	12 \pm 2 [#]	検出されず
クロロキン	27 \pm 8 [*]	試験せず

*p<0.05 vs ビヒクル

[#](Cockcroft et al., Stroke 27: 1393-1398, 1996)より

【0102】

虚血における組織損傷の前記で断定した機構と一致して、クロロキン（ポリアミンオキシダーゼの公知の阻害剤）の投与もまた、そのような投与が中大脳動脈の閉鎖ののち15分遅らされた場合、虚血誘発組織損傷に対して保護した（表II）。アミノグアニジンの保護効果を脳損傷の体積に影響する周辺心臓血管パラメータの変更に帰することはできないことは以前に報告されている（Cockcroft et al., Stroke 27:1393-1398, 1996）。同様に、クロロキンは、大脳虚血に対する全身性ホメオスタシス反応を有意に変化させなかった。虚血の前及び最中に計測した生理学的パラメータ（血圧、心拍数、体温、動脈血ガス）は、ビヒクル又はクロロキンで処理された対象のグループの間で異ならなかった。したがって、クロロキンの大脳保護効果は、大脳虚血に対する周辺心臓血管応答の変更に帰することはできず、代わりに、PAO活性を阻止するクロロキンの活性に関連すると思われる。

【0103】

以前、Iadecolaとその同僚が、大脳虚血の24～48時間後にiNOSがアップレギュレーションされ、アミノグアニジンの遅延投与が遅延した治療範囲で二次的なNO媒介脳損傷を防ぐことができることを報告した（Zhang et al., Stroke 27:317-323, 1996）。他方で、本例における証拠は、ポリアミンオキシダーゼ活性が大脳虚血後はるかに早期に（2時間以内）アップレギュレーションされ、アミノグアニジンの早期投与が3-アミノプロパナールの生成を阻止することを示す。これらのデータのもっとも直接的な解釈は、ポリアミンオキシダーゼの構造的に別個の2種の阻害剤が、3-アミノプロパナールの形成を防ぐことによ

って虚血損傷を防止したということであるが、他の可能性を排除するために一連のさらなる実験を実施した。

【0104】

超薬理学的量のクロロキン (1 mM) の添加でさえ、RAW264.7細胞溶解質で計測される iNOS 活性を阻止することはできなかった (対照培養物中の iNOS 活性 = 13300 ± 250 DPM/ μ g タンパク質 に対し クロロキン 処理培養物中の iNOS 活性 = 11800 ± 900 DPM/mg タンパク質; $P > 0.05$)。したがって、これらのデータは、iNOS の予期されない阻害によってクロロキン保護が生じたという見込みのない可能性を排除する。

【0105】

PAO 阻害剤の存在で細胞生存率を計測したとき、HTB11細胞中で一晚インキュベートした後の3-アミノプロパナールのLD₅₀が、アミノグアニジン又はクロロキンを加えるかどうかにかかわらず類似していることが認められた。したがって、これらのデータは、アミノグアニジン又はクロロキンが、3-アミノプロパナールの細胞傷害性活性を直接妨害することによって細胞を保護するかもしれないという見込みのない可能性を排除する。

【0106】

アミノグアニジンを、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) で処理した一次ニューロン培養物に加えたとき、細胞傷害性の弱化は見られなかった (表 III)。したがって、これらのデータは、アミノグアニジン保護の機構が、グルタミン酸塩の細胞傷害性に対する細胞の感度変化することによって媒介されるという見込みのない可能性を排除する。培養した海馬ニューロン (インビトロ 2~15日) を、グルタミン (100μ M) 及びグリシン (10μ M) で補足した MEM (血清なし) 中で NMDA (500μ M) に5分間暴露し、アールの塩基塩溶液ですすぎ、標準条件下で24時間 (37℃) インキュベートした。トリパンブルーの取り込み対排除に関して細胞体のサンプルを数えることによってニューロン生存率を顕微鏡的に評価した。NMDAの直前及び最終的なすすぎでアミノグアニジン又は非競合的な刺激性アミノ酸レセプター拮抗薬 MK-801 を、表に示す濃度で加えた。データは、3回の複製実験からの9個のウェルの平均±

s. e. である。表IIIは、アミノグアニジンがNMDA神経毒性に対して保護的ではなかったことを示す。

【0107】

【表4】

表III

細胞生存率 (% 死亡)

[アミノグアニジン] (μ M)	NMDA (500 μ M)	MK-801 (20 μ M)	神経毒性 (% 死亡)
0	—	—	3 \pm 1
0	+	—	88 \pm 4
0	+	+	8 \pm 3
1000	+	—	79 \pm 4
1000	—	—	7 \pm 2

【0108】

3-アミノプロパナールがiNOS活性の誘導によって細胞死を媒介するかどうかを判定するため、さらなる実験を実施した。3-アミノプロパナールで処理したグリア細胞へのiNOS阻害剤(L-N^G-モノメチルアルギニン(L-NMMA)又はアミノグアニジン)の添加は、サイトフルオログラフィーによる計測では、TUNEL陽性の発現を減衰することはできなかった。これらのデータは、アミノグアニジン又はクロロキンが大脳虚血に対して保護するかもしれない多数の可能な代替機構を排除したが、クロロキンの他の活性が梗塞に対する認められた保護(すなわち、フリーラジカル形成、ホスホリパーゼ活性又はタンパク質合成の阻害)にさらに貢献するかもしれないということが依然として理論的には可能である。しかし、そのような代替機構は、1) 虚血の状況でポリアミノキシダーゼ活性の阻害剤の投与が3-アミノプロパナールの形成を制限すること、2) 3-アミノプロパナール細胞傷害性をクロロキンで阻止することはできないこと、また、3) クロロキン又はアミノグアニジンが大脳皮質内スベルミン又は虚血の脳損傷効果を防いだことを示すこの一連の証拠を説明しない。

【0109】

例5: インビボ及びインビトロスクリーニング検定結果: 活性化化合物

インビトロで3-アミノプロパナール誘発細胞傷害性に対して保護的である化合物

例3に記載のインビトロスクリーニング検定の使用は、虚血後の組織損傷の程度を軽減する際の、特に発作に伴う脳損傷に対する治療薬剤として臨床利用が予想される化合物の同定を可能にする。当該技術で周知の条件下で複製グリア細胞培養物(HTB14)又はニューロン細胞培養物(HTB11)を培養し、一連の濃度の3-アミノプロパナール(たとえば3200 μ Mから25 μ Mまでの2X希釈シリーズ)に暴露した。試験化合物は、例3の詳細な手順にしたがって、3-アミノプロパナールの添加と同時に又は添加前もしくは添加後の種々の時点で加えて、インビボでの病巣虚血に伴う組織損傷に対する同様な軽減効果を予想させるインビトロ検定で有益な保護効果に関して(又は留意すべき毒性効果に関して)試験化合物を評価することを可能にした。このインビトロ検定におけるグリア様及びニューロン様細胞の使用は、大脳虚血又は発作の細胞傷害性及び組織損傷をモデル化するように特に適合されている。これらの方法により、多様な試験化合物を1.0mMの濃度で評価し、結果を以下の表IVにまとめる。

【0110】

【表5】

表 IV

3-A P細胞傷害性に関する試験化合物の効果

効果なしまたは弱い 保護効果	毒性	保護
グリア細胞アッセイ (HTB 14)		
ブトキシ アミノアミン ベンジラミン 2,3-ジアミノ-2-プロパン 0-メチル フェニルエーテル 3-(2-フェニル-2-オキシエチル)-4-メチル チアゾール チアゾール HCl 2-メルカプトトリス 6-メルカプトトリス p213b	3-(2-フェニル-2-オキシエチル)- 4-メチル-5-(ヒドロキシエチル)- チアゾール 2-メルカプトトリス p117a p213a	p25 p27b 3-(2-メチル-2-オキシエチル)- ベンジラミン 2-メルカプトトリス γ-ブチロ システイン N-アセチルシステイン 2-メルカプトトリス γ-ブチロ p27a
ニューロン細胞アッセイ (HTB 11)		
	N-アセチルシステイン γ-ブチロ	p25 p27a p27b システイン

[0111]

表中：

p 25 は、3-(2-フェニル-2-オキシエチル)-チアゾリウムプロミドであり、この化合物にはまた、PICVA-25の符号が付けられ；

p 27 b は、3-(2-フェニル-2-オキシエチル)-4-メチル-5-(ヒドロキシエチル)-チアゾリウムプロミドであり、

p 27 a は、N-(2-フェニル-2-オキシエチル)-ピリジニウムプロミドであり、この化合物にはまた、APIおよびPICVA-27の符号が付けられ；

p 213 a は、2-(2-フェニル-2-オキシエチル)-2-メルカプトイミダゾールエーテルであり、

p 213 b は、N, N'-ビス-(2-フェニル-2-オキシエチル)-イミダゾリウムプロミドであり、

p117aは、N-(2-フェニル-2-オキシエチル)-2-メルカプトビ
リジニウムブロミドである。

【0112】

例3のスクリーニング検定の代替態様では、種々の濃度の試験化合物（たとえ
ば10~1000 μ M）を、一定濃度（たとえば200 μ M）の3-APの存在下
、指示薬細胞とともにインキュベートした。試験化合物の毒性は、3-APなし
でインキュベートした並行培養物で評価することができる。一般に、所望の試験
化合物は、3-APに対する保護を与える化合物よりもはるかに高い用量（たと
えば10~10,000倍）で細胞傷害性を示す。このような試験の結果を以下の
表Vにまとめる。

【0113】

【表6】

表V

3-AP細胞傷害性に対する試験化合物の効果

効果なしまたは弱い 保護作用	毒性または効果なし	保護 (50%有効用量: 50%毒性用量)
グリブ細胞アッセイ (HTB14)		
AP6	AP9	AP5 (150 μ M, 7mM)
AP2	AP12	p27a (425 μ M, 5mM)
AP7	AP19	AP21 (100 μ M, 試験せず)
YA1	AP20	AP22 (100 μ M, 1mM)
YA2	AP23	TH (175 μ M, 20mM)
AP18	AP28	
AP24	3,5-ジ-tert-ブチル-4-ヒ ドロキシベンズ酸	
3AP		

【0114】

表中：

AP6は、N-(2-フェニル-2-オキシエチル)-2-(2'-ビリジン)
)-ビリジニウムブロミドである。

AP2は、N-(2-フェニル-2-オキシエチル)-キノリニウムブロミド
である。

AP7は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-ピラジニウムブロミドである。

YA1は、2-フェニル-2-オキソエチル-ジメチルホスホナートである。

YA2は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-トリエチルアンモニウムブロミドである。

AP18は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-4-tert-ブチルピリジニウムブロミドである。

AP24は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-3-n-ブチルピリジニウムブロミドである。

34Pは、ピリジン-3, 5-ジカルボン酸である。

AP9は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-4-N, N-ジメチルアミノ-ピリジニウムブロミドである。

AP12は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-ピラジニウムブロミドである。

AP19は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-3-フルオロピリジニウムブロミドである。

AP20は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-4-エチルピリジニウムブロミドである。

AP23は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-2, 6-ジヒドロキシメチルピリジニウムブロミドである。

AP28は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-3, 5-ジヨード-4-ピリジノンである。

AP5は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-2, 5-ジカルボキシピリジニウムブロミドであり、この化合物にはまた、PICVA-13の符号が付けられる。

AP21は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-3, 4-ジカルボキシアミド-ピリジニウムブロミドである。

AP22は、N-(2-フェニル-2-オキソエチル)-3-ブロモ-5-カルボキシピリジニウムブロミドである。

THは、チオプロニン (THIOLA (登録商標)) であり、化学的には、N-(2-メルカプトプロピオニル) グリシンである。

【0115】

インビボで3-アミノプロパナール誘発細胞傷害性に対して保護的である化合物

例2及び4に記載のインビボスクリーニング検定の使用は、虚血後の組織損傷の程度を軽減する際の、特に発作に伴う脳損傷に対する治療薬剤として臨床利用が予想される化合物の同定を可能にする。インビボスクリーニング検定の使用は、例3のインビトロ検定との比較において3-AP毒性の薬理学的阻害剤として同定された化合物及び組成物の潜在的な有利な効果をさらに立証するために特に貴重である。3-AP細胞傷害性の阻害剤としてインビトロで同定された3種のフェニルアシルピリジニウム誘導体を前記インビボ検定法によって評価した。図6に示すように、3種の異なるフェニルアシルピリジニウム誘導体 (PICVA-13、PICVA-25及びPICVA-27と指定) のいずれかを虚血の発生後15分 (MCAの分割時間として操作的に定義) から腹腔内投与したとき、最終的に梗塞を起こした脳組織の体積は、ビヒクルで処理した対照と比較して有意に減少した。化合物PICVA-13を用いると、この保護効果は用量依存性であった (図7を参照)。また、PICVA-13を虚血の発生後3時間で投与したとき、化合物PICVA-13の保護効果は600mg/kgの用量で得られた (図8を参照。梗塞サイズの70%の減少。P<0.05)。PICVA-13治療によるこの用量依存性の保護は、発作における脳損傷の程度に影響することから知られる全身性パラメータ (たとえば血圧、心拍数、体温、血清グルコースならびに動脈pH、 PO_2 及び PCO_2 ; 虚血の発生後60分及び120分でサンプリングしたこれらのパラメータは、ベースラインから有意に異ならなかった) から独立していた。また、脳浮腫の指標は、PICVA-13で処理した対象と対照で処理した対象とで異ならなかった。

【0116】

加えて、THを、虚血の発生後15分 (100mg/kg) 及び虚血の発生後3時間 (50mg/kg) で腹腔内投与した。ビヒクルで処理した対照を含め、グループあたり9匹の実験動物を試験した。対照グループでは、得られた梗塞サイズは9

. $0.7 \pm 1.01\%$ 半球体積であり、TH処理グループでは、梗塞サイズは $4.11 \pm 0.84\%$ 半球体積であり、梗塞サイズにおける 50% 超の減少であった。 $P < 0.001$

[0117]

この例は、3-アミノプロパナール細胞傷害性の薬理的阻害剤が、実験的発作で損傷した脳の体積を有意に制限し、人間の臨床使用のための治療剤としてのそのような薬剤の利用性を予想させるという証拠を提供する。

[0118]

フェニルアシルピリジニウム化合物の全実験動物毒性

前記に報告したインビボスクリーニングで、認められるほどの致死率（それぞれ 25% 及び 38% ）が、化合物 P I C V A - 25 及び P I C V A - 27 での処理に伴った。P I C V A - 13 処理に伴う死は起こらなかった。さらなる試験が、他の方法で処理されたマウスが $1.0 \text{ mg/kg} \sim 1000 \text{ mg/kg}$ の範囲の P I C V A - 13 の用量の投与後7日の時点で死ななかったことを示した（2匹のマウスを用量条件にしたがって処理した。 1.0 、 10 、 100 、 500 及び 1000 mg/kg ）。 $20 \sim 25$ グラムの雄 B a l b / c マウスを腹腔内注射によって P I C V A - 13 で処理し、その後7日間の生存に関してマウスを観察した。すべてのマウスが生き残り、明白な毒性の兆候を示したマウスはなく、観察期間にわたって正常なグルーミング及び採餌を示した。この毒性の欠如は、化合物 P I C V A - 13 を好ましい化合物として確立した。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、脳虚血の際に上昇したポリアミノオキシダーゼ活性が、アミノグアニジン及びクロロキンによって阻害されたことを示す。ポリアミノオキシダーゼ活性は、脳ホモジネート内で測定した。示したデータは、平均土標準偏差； $n = 3$ である。「正常」＝シャム手術した対照脳ホモジネート；「虚血ビヒクル」＝中大脳動脈閉塞の開始2時間後に調製したホモジネート；「虚血AG」＝スベルミンの5分前の時点でのアミノグアニジン (1 mM) の添加；及び「虚血CHLQ」＝スベルミンの5分前の時点でのクロロキン (1 mM) の添加。 $*P < 0.05$ 対

正常; #P<0.05対虚血ビヒクル。

【図2】

図2は、脳内3-アミノプロパナール濃度が、脳虚血の際に上昇することを示す。脳内3-アミノプロパナール濃度は、恒久的病理性脳虚血に付したラットにおける誘導及びHPLCアッセイ(上記のとおり)によって測定した。3-アミノプロパナールは、シャム手術した対照では検出されなかった。3-アミノプロパナールの組織内濃度は、中大脳動脈閉塞後2時間以内に顕著に上昇し、少なくとも更に25時間上昇し続けたことに留意されたい。示したデータは、平均±標準偏差; n=3匹/群である。*P<0.05対t=0時間(ANOVAによる)。

【図3】

図3は、皮質内投与されたポリアミン、及びその代謝物である3-アミノプロパナールの脳損傷効果を示す。脳損傷(梗塞又は細胞傷害の容積)は、スベルミン、スベルミジン、3-アミノプロパナール及びブトレッシンの皮質内微量注射(マイクロインジェクション)後に測定した。示したデータは、示したポリアミン類を注射した動物の大脳半球全体にわたってネガティブTTC染色の部域を組み込むことによって測定した限りでの、脳損傷の容積(mm³)であり; 平均±標準偏差; n=6~8匹/群である。*P<0.05対ビヒクルであった。注目すべきことに、ブトレッシンは、組織損傷を生起せず; PAOによって3-アミノプロパナールを生じるよう代謝されたポリアミンの基質、又は3-アミノプロパナール自体が脳損傷性であった。

【図4】

図4は、アミノグアニジン及びクロロキンが、皮質内スベルミン毒性に対して保護作用を示したことを示す。動物には、すべて、前記のような、立体空間的に案内された微量注射によって皮質内スベルミン(2 μ l中25 μ g)を与えた。実験動物には、下記の用量計画に従って、皮質内スベルミンと連携してアミノグアニジン又はクロロキンを投与した: 全身性アミノグアニジンは、320mg/kg、i.p.(腹腔内)を30分前の前処理として、次いで110mg/kg、i.p.の後続用量を、それぞれ皮質内スベルミンの8時間後に与え; 皮質内アミノグアニジンは、

単発用量 (320 mg/kg) を皮質内スベルミンと同時に与え; クロロキンは、単発腹腔内用量 (25 mg/kg) を、スベルミン注射の30分前に与えた。示したデータは、皮質内スベルミン注射の48時間後に定量的に査定した、梗塞容積 (mm³) である (平均±標準誤差; n=6~8匹/群)。*P<0.05対スベルミン/ビヒクルであった。

【図5】

図5は、CPP-32 (カスパーゼ3) ではなく、ICE (カスパーゼ1) の阻害が、3-アミノプロパナール誘導グリア細胞アポトーシスをin vitroで遮断したことを示す。細胞は、0.4 μM (三角) 又は40 μM (丸) の濃度のICE (IL-1β変換酵素) 阻害剤 (Ac-YVAD-OMK) で3時間前処理した後、3-アミノプロパナールで更に5時間処理し、MTTアッセイによって細胞生存率について分析した。対照は、溶媒の非特異的効果を査定するために、DMSO処理した細胞 (四角) とした。

【図6】

図6は、異なる3種類のフェニルアシルピリジニウム誘導体 (PAPD) による脳保護を示す。動物には、虚血開始15分後から始めて、PBSビヒクル (n=13) 又はPAPDのいずれかを腹腔内注射によって与えた。PICVA-25 (n=9; 総用量200 mg/kg)、PICVA-27 (n=12; 総用量200 mg/kg)、PICVA-13 (n=8; 総用量400 mg/kg)。示したデータは、mm³で表わした、平均卒中発作 (梗塞) 容積±標準誤差である。*P<0.05 (一方向ANOVAによる)。

【図7】

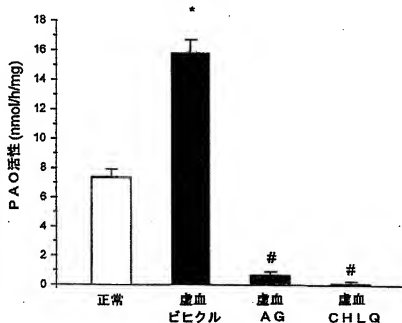
図7は、実験的に誘導した病巣性脳虚血後の脳保護についてのin vivoスクリーニングアッセイにおける化合物PICVA-13についての用量: 応答の相関を示す。動物には、虚血の発症15分後から始まってPBSビヒクル (n=13) 又はPICVA-13のいずれかを腹腔内投与した。PICVA-13は、60 mg/kg (n=6)、200 mg/kg (n=6)、400 mg/kg (n=11)、又は600 mg/kg (n=13) 投与した。示したデータは、mm³で表した梗塞容積±標準誤差である。*P<0.05 (一方向NOVAによる)。

【図8】

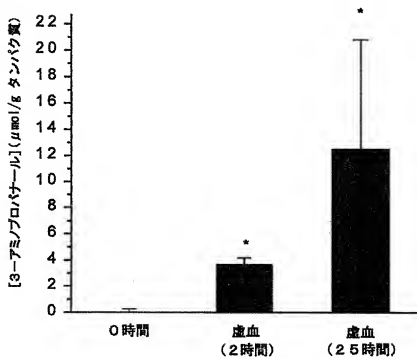
図8は、PICVA-13投与による好都合な脳保護効果が、虚血開始後少なくとも2時間可能であることを示す。動物には、虚血開始後2時間から始めて、PBSビヒクル ($n=10$) 又はPICVA-13のいずれかを、400mg/kg ($n=8$) 又は600mg/kg ($n=9$) の用量で与えた。示したデータは、 mm^3 で表わした、容積 \pm 標準誤差である。 $*P<0.05$ (一方向ANOVAによる)

。

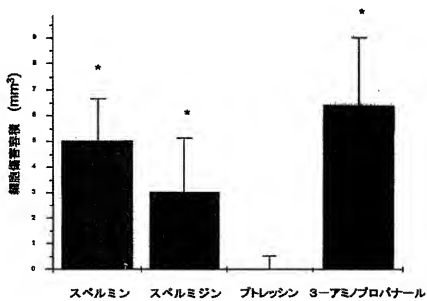
【図1】



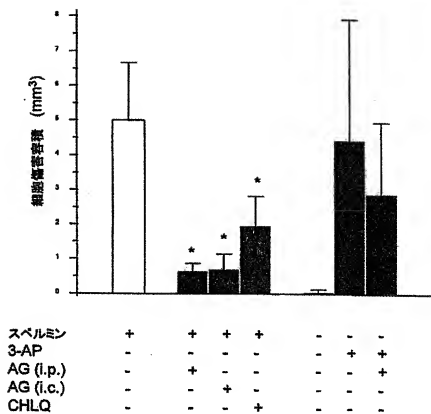
【図2】



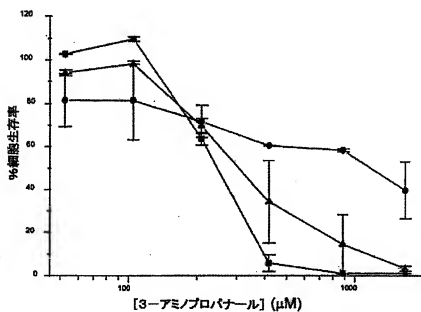
【図3】



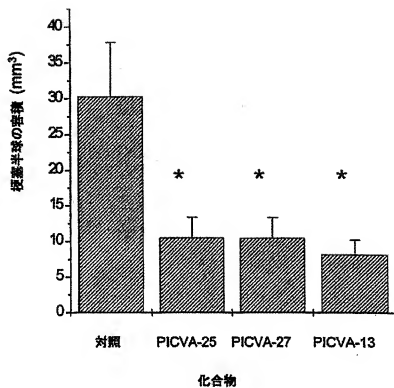
【図4】



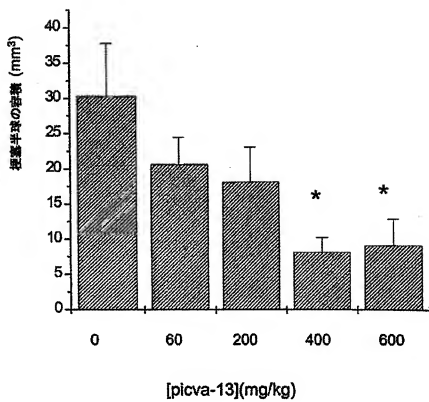
【図5】



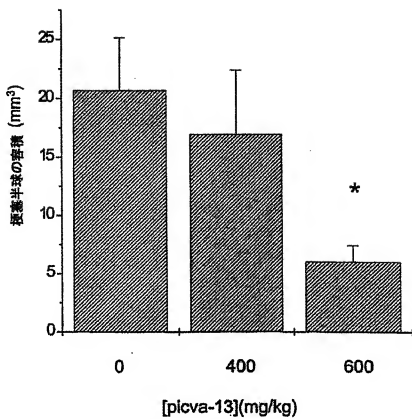
【図6】



【図7】



【図8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/16056

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(9) : A61K 31/435
US CL. : 544/226; 514/354

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 546/226; 514/354

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,22,3510 A (GUBIN et al) 29 JUNE 1993, col. 48, lines 6-7.	1,3,5
X	US 4,324,855 A (OISHI et al) 13 APRIL 1982, see formula III.	1,2,5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family names.

* "A"	Special categories of cited documents: documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"A"	document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document published on or after the international filing date, document which may have doubts as to priority status or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or obvious as considered in the art as it exists when the document is taken alone
"Y"	document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other event	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"Z"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"Z"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 NOVEMBER 1999

Date of mailing of the international search report

02 DEC 1999

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231
Facsimile No. (703) 505-3230Authorized officer
ROBERT HASTIE
Telephone No. (703) 505-1225

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)*

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/16066

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17C(4) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not defined in accordance with the second and third sentences of Rule 6A(5).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Please See Extra Sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-21

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/J899/16066

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION WAS LACKING

This ISA found multiple inventions as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-21, drawn to pyridines.

Group II, claim(s) 22-25, drawn to a method.

Group III, claim(s) 26-27, drawn to a testing assay.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: The methods of groups II and III require different compounds than recited in group I.

フロントページの続き

(51)Int. Cl.	識別記号	F I	キーワード (参考)
A 6 1 P 43/00	1 1 1	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 D 213/82		C 0 7 D 213/82	
277/40		277/40	
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z
33/50		33/50	Z
(72)発明者	アルーアベド、ヨーセフ		
	アメリカ合衆国、ニューヨーク 10021、		
	ニューヨーク、ヨーク・アベニュー		
	1435、アパートメント 5シー		
(72)発明者	イワノワ、スベトラーナ		
	アメリカ合衆国、ニューヨーク 11105、		
	アストリア、22-31-35ティエーエイチ・ス		
	トリート		
(72)発明者	ブカラ、リチャード・ジェイ		
	アメリカ合衆国、コネチカット 06807、		
	コス・コブ、ベネンソン・ドライブ 22		
F ターム (参考)	2G045 AA29 AA40 BB20 BB24 CB01		
	CB26 DA20 DA80 FA37 FB06		
	GC30 JA20		
	4C033 AD13 AD17 AD20		
	4C055 AA10 BA02 BA57 CA02 CA57		
	DA01 DA57 GA01		
	4C086 AA01 AA03 BC17 BC82 MA04		
	NA14 ZA15 ZA36		